



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**QUIMILUMINESCÊNCIA UTILIZANDO LECTINAS CONJUGADAS A ÉSTER
DE ACRIDINA NA AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DE TUMORES CUTÂNEOS
E DA INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO**

Aluna: Luiza Rayanna Amorim de Lima

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Co-orientador: José António Couto Teixeira

**Recife – PE
2015**

LUIZA RAYANNA AMORIM DE LIMA

**Quimiluminescência utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina na
avaliação histoquímica de tumores cutâneos e da interação lectina-
carboidrato**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientador:

Prof. Dr. José António Couto Teixeira

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Recife – PE

2015

Lima, Luiza Rayanna Amorim de

Quimiluminescência utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina na avaliação histoquímica de tumores cutâneos e da interação lectina-carboidrato/ Luiza Rayanna Amorim de Lima – Recife: O Autor, 2015.

165 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientadores: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão e José

Antônio Couto Teixeira

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Biologia Aplicada à Saúde,
2015.**

Inclui referências e anexos

- 1. Pele- câncer 2. Quimiluminescência 3. Lectinas I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (coorientador) III. Teixeira, José Antônio Couto (coorientador) IV. Título**

Lima, LRA

**Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde**

Parecer da comissão examinadora da defesa de tese de doutorado de

LUIZA RAYANNA AMORIM DE LIMA

**Quimiluminescência utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina na
avaliação histoquímica de tumores cutâneos e da interação lectina-
carboidrato**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **LUIZA RAYANNA AMORIM DE LIMA** como:

APROVADA

Recife, 29 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Orientador
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Co-Orientador
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior
(Membro Interno)
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
(Membro externo)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
(Membro externo)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Lima, LRA

Ao meu avô, Sebastião Amorim (*in
memorian*), pelo exemplo de força,
dedicação e coragem.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, pela vida e força dada para superar todas as dificuldades que apareceram ao longo do caminho.

Aos meus pais (Rosineide e Hosman) e minha avó Luiza e ao meu avô Sebastião (*in memorian*) pelo exemplo que sempre foram para mim e por todo amor, carinho, apoio e compreensão que recebi durante toda minha vida.

Ao meu irmão, Filipe, pela amizade e companheirismo.

À minha vó Izaura e às minhas tias Naide e Leda pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, pelos ensinamentos, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. José António Couto Teixeira, pelo apoio e confiança durante a minha estada na Universidade do Minho.

Ao Prof. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, pelo apoio, ensinamentos, confiança e companheirismo em todos os momentos.

À minha amiga de infância e companheira de trabalho Gabriela Ayres pelo apoio, companheirismo e paciência em todas as horas.

Às minhas amigas Sinara e Lúcia (L₃S) pela parceria, apoio, paciência, compreensão e pelas horas de diversão.

Aos amigos Mariana Cabrera, Roziana Jordão, Adriana Andrade, Nara Barbosa, Matheus Bezerra, Ricardo Souza, Antônio Felix, Moacyr Barreto, Thiago Verás, Anna Gabriela Pinto, por todo carinho, apoio, dedicação e pela ajuda primordial no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas de infância, Raquel, Maria Christina e Andréa pela grande amizade que dedicaram a mim.

Aos amigos do Laboratório de Fernentações do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Sara Silvério, João Graça Martins, André Antunes, Sheyla Silva, Tatiana Holanda, Maria Carolina Wanderley, Vânia Pôjo, Karla Teixeira, Lina Ballesteros, Aloia Romani, Eduardo Coelho e Ana Rodrigues por todo carinho e apoio que dedicaram a mim no momento tão importante da minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do LIKA Arthur, Bruno Trajano, Steffany Ferreira, Carmelita Cavalcanti e Marina Cartaxo pela amizade e por terem me acolhido com todo carinho.

Aos amigos que fazem o LIKA Rafael Padilha, Vera, Edson, Moisés, Sr, Otaviano, Ilma, Conceição e Paulina pela amizade e auxílio concedido sempre que solicitado.

RESUMO

Com o objetivo de criar um modelo biológico reprodutível e eficiente que possa mimetizar a interação proteína-carboidrato, nós reportamos o uso do ensaio quimiluminescente com lectinas conjugadas a éster de acridina (EA) para investigar a complexação da lectina ao carboidrato e para avaliação quantitativa da expressão de carboidratos em tumores cutâneos. Polissacarídeos de N-acetil-D-glicosamina (quitosana), glicose (phytagel) e galactose (carragenana) foram utilizados para sintetizar membranas (0,0314 – 0,6358 cm²). Concanavalina A-EA (Con A), Wheat germ aglutinina (WGA), Peanut aglutinina (PNA), Ulex europeus aglutinina-I (UEA-I) e Maackia amurensis aglutinina (MAA) foram conjugadas a EA. A atividade hemaglutinante das lectinas-EA foi avaliada e a quimiluminescência quantificada e expressa em Unidades Relativas de Luz (URL). Biópsias de pele normal e de tumores cutâneos, tais como ceratose actínica (AK), ceratoacantoma (KA), carcinoma espinocelular (CEC) e basocelular (CBC), e as membranas foram incubadas com o conjugado lectina-EA (100 µL 100 µg mL⁻¹) por 2h a 4°C. A emissão de fótons foi quantificada e correlacionada com a marcação de tecidos normais, transformados e das membranas. Inibições com carboidratos específicos foram realizadas. AK, KA, CBC e CEC apresentaram menor expressão de α-D- glucose/manose e resíduos de α-L- fucose, em comparação com o tecido normal. Os tumores cutâneos apresentaram maior expressão resíduos de β Gal-(1-3)-GalNAc que o tecido normal. AK e SCC exibiram maior expressão de resíduos Neu5Ac-α(2,3)Gal que a epiderme normal. KA e BCC apresentaram

valores de URL equivalentes, em comparação com o tecido normal. Os valores de URL diminuíram quando as lectinas foram incubadas com seus carboidratos específicos. Os valores das constantes e os sítios de ligação foram calculados para cada lectina utilizando a equação obtida a partir das curvas hiperbólicas, $2,4 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \pm 0,8 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ and $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0,3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Con A); $0,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \pm 0,4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ and $0,021 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0,003 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (WGA) and $2,0 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \pm 0,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ and $0,069 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0,010 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (PNA). O método quimiluminescente permitiu a avaliação quantitativa direta da expressão de carboidratos em neoplasias de pele e a investigação a complexação da lectina ao carboidrato através do modelo de Langmuir, combinando a especificidade desta interação e a sensibilidade dos ensaios quimiluminescentes.

Palavras chaves: carboidratos; polissacarídeos; quimiluminescência; tumores cutâneos;

ABSTRACT

Aiming to create a reproducible and efficient biological model that mimic the protein-carbohydrate interaction, we report the use of chemiluminescent assay with lectins labeled to acridinium ester (AE) to investigate the complexation of lectin to carbohydrate and for the quantitative evaluation of carbohydrates expression in cutaneous tumors. Polysaccharides made N-acetyl-D-glucosamine (chitosan), glucose (phytagel) and galactose (carrageenan) were used to synthetize membranes (0,0314 – 0,6358 cm²). Concanavalin A-AE (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA), Peanut agglutinin (PNA), Ulex europeaus agglutinin-I (UEA-I) e Maackia amurensis agglutinin (MAA) were labeled to AE. The hemmagglutinating activity of lectins-AE was evaluated and the chemiluminescence was quantified and expressed in Relative Light Unit (RLU). Biopsies of normal skin and cutaneous tumors such as, actinic keratosis (AK), keratoacantoma (KA), squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BCC), and membranes were incubated with lectins-AE (100 µL 100 µg mL⁻¹) for 2h at 4°C. Photon emission was measured and correlated to the labeling of the normal, transformed tissues and membranes. Inhibitions with specific carbohydrate were carried out. AK, KA, SCC and BCC showed lower expression of α -D-glucose/mannose and α -L-fucose residues compared to normal tissue. Cutaneous tumors displayed higher expression of Gal-(1-3)-GalNAc residues than normal tissue. AK and SCC exhibited higher expression of Neu5Ac-(2,3)Gal residues than normal epidermis. KA and BCC showed equivalent RLU values compared to normal tissue. The RLU values decreased when the lectins were incubated with their specific carbohydrate. The constant values and maximum binding sites on the membranes were calculated for each

lectin using the equation obtained from hyperbolic curves, $2.4 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \pm 0.8 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ and $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Con A); $0.9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ and $0.021 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0.003 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (WGA) and $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \pm 0.9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ and $0.069 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0.010 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (PNA). The chemiluminescence method allowed quantitative assessment of the carbohydrate expression in cutaneous tissues and was an analytical technique efficient to investigate the complexation of lectin to carbohydrate through Langmuir model, combining the specificity this interaction and sensibility of chemiluminescent assays.

Keywords: carbohydrates; chemiluminescence; cutaneous tumors; polysaccharides;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Fatores etiológicos que contribuem para o desenvolvimento de NMSC.	6
Figura 2	Imagem histológica da ceratose actínica (magnificação original 200x): presença de paraceratose (seta preta) e elastose solar da derme (seta vermelha). Presença de infiltrado inflamatório.	10
Figura 3	Apresentação clínica da ceratose actínica.	11
Figura 4	Imagem histológica da fase proliferativa do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).	12
Figura 5	Imagem histológica da fase de maturidade do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).	13
Figura 6	Imagem histológica da fase involutiva do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).	13
Figura 7	Ceratoacantoma com placas rosa, bordas elevadas e presença de úlcera crateriforme no centro da lesão.	15
Figura 8	Imagem histológica do Carcinoma Invasivo de Células Escamosas (magnificação original 100x). Presença de células epiteliais escamosas que surgem na epiderme e estende-se profundamente na derme (seta preta). Nesta lesão observa-se a presença de pérolas córneas (seta vermelha).	16
Figura 9	Apresentação clínica do Carcinoma Cutâneo de Células Escamosas.	17
Figura 10	Imagem histológica do carcinoma basocelular padrão nodular (magnificação original 200x). Observa-se a presença de “ilhas” de células basalóides (setas pretas), com disposição em paliçada (seta vermelha) das células na periferia e arranjo desorganizado das células no interior do tumor.	19
Figura 11	Apresentação clínica do carcinoma de células basais. A lesão apresenta grande nódulo com ulceração central, aparência perolada e presença de teleangiectasia.	20
Figura 12	Estrutura dos setes monossacarídeos que compõem os glicanos ligados às proteínas.	21

Figura 13	Principais carboidratos envolvidos em importantes funções fisiológicas.	22
Figura 14	Síntese de glicoconjugados a partir da glicose através da via de biossíntese da hexosamina (HBP).	23
Figura 15	Representação esquemática dos carboidratos que participam dos principais eventos fisiopatológicos durante a progressão do tumor.	25
Figura 16	Interações de superfície celular lectina-carboidratos.	29
Figura 17	Exemplos esquemáticos dos principais tipos de lectinas animais, com base na estrutura da proteína.	32
Figura 18	Classificação das lectinas de acordo com a quantidade de CDR.	33
Figura 19	Interação dos monossacarídeos do gangliosídeo GM1 ligado à subunidade B da toxina da cólera.	36
Figura 20	Diagrama esquemático da estrutura tetramérica da Con A no qual se observam os quatro sítios de ligação para carboidratos.	38
Figura 21	Estrutura cristalina da isoforma 1 da lectina dimérica WGA. Cadeia polipeptídica 1 em verde e a 2 em ciano.	40
Figura 22	Representação da estrutura tridimensional da PNA ligada à sequência Gal-β(1-3)-GalNAc por interações de van der Waals. As quatro subunidades estão indicadas por A, B, C e D. As esferas magenta e ciano representam os íons Mn^{2+} e Ca^{2+} , respectivamente.	41
Figura 23	Representação da estrutura tridimensional da UEA.	42
Figura 24	Estrutura tetramérica da MAA. Os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} estão representados como esferas verde e magenta, respectivamente.	44
Figura 25	Relação entre quimioluminescência e área de tecido mamário diagnosticado como carcinoma ductal invasivo. A emissão de fótons, expressa em unidades relativa de luz (URL), foi detectada a partir de amostras de tecidos diferentes tratados com concanavalina A conjugada ao éster de acridina (Con A-EA).	49
Figura 26	Relação entre URL e a área de tecido mamário diagnosticado como fibroadenoma (□) e CDI (■) empregando ConA-AE.	50

Figura 27	Relação entre URL e a área de tecido mamário diagnosticado como fibroadenoma (□) e CDI (■) empregando PNA-AE.	51
Figura 28	Conjugação do EA à proteína e reação quimiluminescente do anel acridona conjugado à biomolécula.	54
Figura 29	Reação quimiluminescente do EA	55

Capítulo 1

Figure 1	Comparison between the chemiluminescence of normal epidermis (NE, $n = 14$), actinic keratosis (AK, $n = 9$), keratoacanthoma (KA, $n = 13$), squamous cell carcinoma (SCC, $n = 13$), and basal cell carcinoma (BCC, $n = 17$) labeled with Con AAE, PNA-AE, UEA-AE, and MAA-AE. (*) Statistically significant variations were observed among RLU values of cutaneous tumors and normal epidermis. (**) Statistically significant variations were observed among RLU values of cutaneous tumors.	81
-----------------	--	-----------

Capítulo 2

Figure 1	Relation between the RLU and Con A-AE (a), WGA-AE (b) and PNA-AE (c) amount. The linear correlation allowed converting RLU to moles of lectins.	93
Figure 2	Membranes synthesized with phytagel (A), chitosan (B) and carrageenans (C) and their discs (below) produced by using homemade molds (right).	93
Figure 3	Lectin binding inhibition assay on membranes. Con A-AE (A), WGA-AE (B) and PNA-AE (C) were either previously inhibited with methyl- α -D-mannopyranoside, N-acetyl-D-glucosamine and D-galactose, respectively, or inhibited with non-labeled lectins.	94
Figure 4	Relationship between RLU <i>versus</i> offered Con A-AE (A), WGA-AE (B) and PNA-AE (C). Membrane areas ranged from 0.0314 – 0.6358 cm ² and the sugar contents were converted to μ g from the polysaccharide composition.	96

Anexo 1

Figure 1	TEM images of magnetic nanoparticles (A) and mPANI (B).	133
Figure 2	Temperature (A) and pH (B) effect on immobilized (●) and soluble (■) β -galactosidase activity. Enzyme activity was performed using 1 mM ONPG as substrate made in buffers with different pH values (5.0 – 10.5), and different temperatures (25 – 60 °C).	138
Figure 3	Operational Stability of immobilized β -galactosidase on mPANI. The activity cycles were performed using 1 mM ONPG as substrate in pH 9.5 at 40 °C.	140
Figure 4	Thermostability study of soluble β -galactosidase (■) and immobilized (●). The free enzyme and IED were incubated at 30 - 90 °C for 30 min. After cooling, enzyme activity was determined using 1 mM ONPG as substrate in pH 9.5 at 40 °C.	141
Figure 5	Analysis of donor and receptor amount and pH influence in enzymatic synthesis of lactulose (A). Time course of lactulose production from lactose and fructose. Reactions were conducted at 40 °C using lactose and fructose 200 g.L ⁻¹ in 50 mM potassium phosphate buffer pH 8.0 (B).	143

Anexo 2

Figure 1	The light emission (RLU) from normal, benign prostatic hyperplasia (HPB) and adenocarcinoma (AP) tissues (n = 15 and triplicates). The inhibited columns were obtained by incubating the tissues with non-labeled antibody previous to anti-Gal3-AE incubation. The statistical analyses showed significance between the mean values ($p < 0.001$).	150
Figure 2	Relationship between RLU and the tissue area of benign prostatic hyperplasia (○), normal tissue (●) and adenocarcinoma (■).	151
Figure 3	Typical immunohistochemical staining for Gal3 in prostate tissues with benign prostatic hyperplasia (A), normal tissue (B) and adenocarcinoma (C). All images were obtained with 200x magnification.	153

Anexo 3

Figure 1	ConA-AE (A), PNA-AE (B), UEA-AE (C) purification profile from a Sephadex G-25 column (10 × 1 cm). Elution was carried out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions (aliquots of 1 mL) were collected for protein 280 nm (□), chemiluminescence (○) and hemagglutinating activity (●) assays.	159
Figure 2	Scheme of the chemiluminescent lectin histochemistry. Paraffin section (8 µm) of biopsies being cut, transferred to glass slide, deparaffinized, rehydrated, treated with trypsin, washed with PBS, incubated with lectins-AE and again washed with PBS. Afterwards the squared-shaped area of tissue section being cut and transferred to a polypropylene test tub and, finally, the chemiluminescence measured and expressed as relative light unit (RLU). A duplicate of the deparaffinized and rehydrated tissue sample was hematoxilin eosin stained for transformed tissue identification.	160
Figure 3	Chemiluminescence in normal prostate tissues (n=5), benign prostatic hyperplasia (n=49) and prostate adenocarcinoma (n=50), using the conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE. Different letters indicate statistically significant. All measurements are mean ± SD of triplicate.	161
Figure 4	Lectin binding inhibition assay in prostate tissues diagnostic as benign prostatic hyperplasia (n= 5) and prostate adenocarcinoma (n=5). The conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE were inhibited using, respectively, methyl-α-D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose. All measurements are mean ± SD of triplicate.	161
Figure 5	Relationship between RLU and area (0.125 to 1.0 cm ²) of prostate tissue diagnosed as benign hyperplasia prostatic and adenocarcinoma prostate by using Con A-AE (A), PNA-AE (B) and UEA-AE (C) conjugates. All measurements are mean ± SD of triplicate.	162

TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1	Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.	5
-----------------	--	----------

Capítulo 2

Table 1	Constant values α calculated from hyperbolic curves using equation 1.	95
Table 2	Constant values of association (K_a) and dissociation (K_d) found to lectins using different analytical methods.	97

Anexo 1

Table 1	Experimental plan and results obtained in experiments of immobilization	134
Table 2	ANOVA for experimental design.	135
Table 3	Optimal conditions of immobilization process of β -galactosidase onto mPANI calculated according to the variables X1, X2, X3 and X4.	136

Anexo 2

Table 1	Result of the immunohistochemical staining from number of positive Gal3 cells in prostatic tissues evaluated by image analysis (total area per field = 12,234 μm^2)	152
----------------	---	------------

LISTA DE ABREVIACÕES

2-DG	2-deoxi-D-glicose
AS	ácidos siálicos
CA	ceratose actínica
CBC	carcinoma basocelular
C_e	concentração do adsorbato no equilíbrio
CEC	carcinoma de células escamosas
CDI	carcinoma ductal invasivo
CMM	cirurgia micrográfica de mohs
Con A	concanavalina A
CS	ceratose seborréica
Cramol	<i>Cratylia mollis</i>
CRD	domínio de reconhecimento ao carboidrato
DMAE-NHS	N-hydroxysuccimide-activated dimethyl acridinium ester
EA	éster de acridina
FDA	food and drug administration
ELISA	“enzyme-linked immunosorbant assay”
ELLAs	ensaio de lectina ligado a enzima
Fuc	fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
Glc	Glicose

GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
Glut	transportadores de glicose
HAPs	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HBP	via biossintética da hexosamina
K_a	constantes de afinidades aparente
K_L	constante de Langmuir
MAA	Maackia amurensis aglutinina
Man	Manose
MPTs	modificações pós-traducionais
NeuNAc	ácidos neuramínicos
NMR	ressonância magnética nuclear
PNA	Peanut agglutinin
PBS	phosphate buffer, containing 0.15 M NaCl
Q_e	quantidade adsorvida por grama do adsorvente
Q_m	constante relacionada com a energia de adsorção
QCM	microbalança de cristal de quartzo
QL	Quimiluminescência
SNA	Sambucus nigra aglutinina
SPR	ressonância plasmônica de superfície
URL	unidade relativa de luz
WGA	Wheat germ agglutinin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Câncer de pele não melanoma (NMSC).....	4
2.1.1 Ceratose Actínica (CA)	9
2.1.2 Ceratoacantoma (KA)	11
2.1.3 Carcinoma de Células Escamosas (CEC)	16
2.1.4 Carcinoma de Células Basais (CBC)	18
2.2 Importância biológica dos carboidratos	20
2.3 Glicosilação e Câncer.....	24
2.4 Lectinas e suas interações com os carboidratos.....	27
2.4.1 Concanavalina A (Con A).....	37
2.4.2 Wheat germ aglutinina (WGA)	38
2.4.3 Peanut aglutinina (PNA).....	40
2.4.4 <i>Ulex europaeus</i> aglutinina-I (UEA-I)	42
2.4.5 <i>Maackia amurensis</i> aglutinina (MAA).....	43
2.5 Isoterma de Langmuir.....	44
2.6 Quimiluminescência	52
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
4. OBJETIVOS	75
4.1 Geral	75
4.2 Específicos	75

5. RESULTADOS	76
CAPÍTULO 1	78
CAPÍTULO 2	85
6. CONCLUSÃO	106
ANEXO 1	107
ANEXO 2	148
ANEXO 3	156

1. INTRODUÇÃO

Os neoplasmas cutâneos podem ser classificados em dois grandes grupos: melanoma, câncer de pele não-melanoma e neoplasias benignas. O último grupo inclui, principalmente, os carcinomas basocelular (CBC) e espinocelular ou de células escamosas (CEC), ceratoacantoma (KA) e ceratose actínica (CA). Estes tumores apresentam crescimento rápido, quando diagnosticados e tratados tardiamente podem ser funcionalmente destrutivos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2015).

Alterações na estrutura e/ou na distribuição de glicanos estão relacionadas às características de malignidade do tumor, como proliferação e crescimento das células tumorais, capacidade de invasão e de metástase, angiogênese e silenciamento do sistema imune. A investigação da expressão dos carboidratos e da interação de proteínas que reconheçam essas biomoléculas torna-se necessária para a compreensão da origem histogenética e o comportamento do tumor durante a sua diferenciação (AUDFRAY et al., 2015).

Lectinas são glicoproteínas de origem não imunológica que possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos de forma reversível e atuam como moléculas de reconhecimento dentro das células, na superfície celular e em fluídos fisiológicos (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011)

Estas proteínas interagem com os carboidratos através de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxil dos carboidratos e os resíduos do

aminoácidos polares (WIMMEROVÁ et al., 2012), e inúmeras técnicas têm sido utilizadas para o estudo dessas interações moleculares (JEYAPRAKASH et al., 2003; MURTHY et al., 2009; CHUANG et al., 2009; SAFINA et al., 2011).

A interação entre carboidratos e lectinas é importante em diversos processos biológicos, como por exemplo, reconhecimento célula-célula, interações célula-matriz extracelular, fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação, sinalização, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação patógeno-hospedeiro, dobramento e endereçamento de glicoproteínas, indução mitogênica e homeostase (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Na histoquímica, lectinas com diferentes especificidades a carboidratos podem fornecer um sistema de detecção sensível para mudanças na expressão de carboidratos (MELO-JÚNIOR et al., 2008). Esta ferramenta tem sido utilizada para mostrar diferenças no padrão glicosilação celular durante diversas doenças tais como, infecções por patógenos (MELO-JÚNIOR et al., 2008), tumores cutâneos (MELO-JÚNIOR et al., 2006), carcinoma mucoepidermóide de glândula parótida (SOBRAL et al., 2010), carcinoma ductal invasivo (KOROURIAN et al., 2008) e carcinoma prostático (LIMA et al., 2010).

Dentre os sistemas de detecção, o ensaio quimiluminescente tem sido uma ferramenta analítica eficiente (BRUSTEIN et al., 2012; LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2014). Quimiluminescência (QL) é definida como a emissão de radiação eletromagnética, geralmente na faixa do visível - infravermelho próximo, produzida por uma reação química (ARAÚJO-FILHO; MELO-JÚNIOR; CARVALHO Jr, 2011). A aplicação da QL na química analítica depende da

acoplagem da substância de interesse a um dos participantes da reação quimiluminescente ou ao produto no estado excitado. A concentração da amostra desconhecida será proporcional à produção de luz total emitida (LARA; GARCÍA-CAMPAÑA; AARON, 2010).

A sensibilidade, a possibilidade de quantificação, a escala dinâmica e a diversidade dos ensaios quimiluminescentes, largamente empregados na revelação de proteínas, ácidos nucleicos (RODA; GUARDIGLI, 2012) e, atualmente, carboidratos (LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2014), tornam a “histoquimiluminescência” uma importante ferramenta auxiliar na histoquímica dos tumores cutâneos.

Além disso, com o objetivo de criar um modelo biológico reprodutível e eficiente que possa mimetizar a interação proteína-carboidrato, nós reportamos o uso do ensaio quimiluminescente com lectinas conjugadas a éster de acridina para investigar a interação da lectina com o carboidrato. Para isto, utilizamos o modelo matemático de Langmuir para propor cálculos das constantes de afinidade aparente (K_a) das lectinas por diferentes carboidratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de pele não melanoma (NMSC)

Câncer de Pele Não-Melanoma (NMSC) é originado das células epidérmicas e constituem uma categoria que engloba todos os tipos de cânceres de pele, excetuando os melanomas, sendo os mais incidentes na população brasileira. Estes tumores são classificados como carcinoma basocelular (CBC), carcinoma espinocelular ou de células escamosas (CEC), ceratoacantoma (KA), ceratose actínica (CA) e ceratose seborréica (CS). É tipicamente encontrado na cabeça, no pescoço, na face e nos braços, mas pode ocorrer em qualquer região do corpo. Estes neoplasmas são raramente fatais, entretanto são considerados tumores de crescimento rápido e quando diagnosticados e tratados tardiamente podem ser funcionalmente destrutivos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2015).

Segundo o INCA (2014), no Brasil, o NMSC continua sendo o tipo mais incidente para ambos os sexos. Esperam-se 98.420 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 83.710 nas mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 100,75 casos novos a cada 100 mil homens e 82,24 a cada 100 mil mulheres (Tabela 1). O câncer de pele não melanoma é o mais incidente em homens nas regiões Sul (159,51/ 100 mil), Sudeste (133,48/ 100 mil) e Centro-Oeste (110,94/ 100 mil). No Norte (28,34/ 100 mil) e Nordeste (40,37/ 100 mil) encontra-se na segunda posição. Nas mulheres, é o mais frequente em todas as regiões, com um risco estimado de 112,28/ 100 mil no Sudeste, 99,31/ 100 mil no Centro-Oeste, 86,03/ 100 mil no Sul, 46,68/ 100 mil no Nordeste e 24,73/ 100 mil no Norte.

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

CBC e CEC são os dois tipos mais frequentes de NMSC, e apesar da baixa taxa de mortalidade esses tumores apresentam importância relevante para os serviços de saúde e podem causar significativa morbidade, uma vez que a maioria dos NMSCs ocorre em áreas de grande visibilidade, tais como cabeça, pescoço e rosto (LOMAS; LEONARDI-BEE; BATH-HEXTALL, 2012).

A maioria dos cânceres de pele ocorre devido à exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), em especial ao ultravioleta tipo B (UVB) a qual promove mutações (Figura 1) em proto-oncogenes e/ou genes supressores do tumor p53 formando dímeros de timina. Falhas na reparação destas mutações

podem resultar na formação do tumor (SAMARASINGHE; MADAN; LEAR, 2011b).

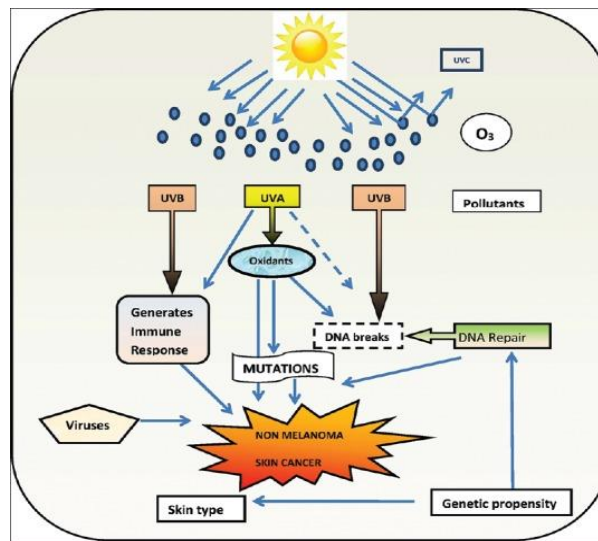


Figura 1. Fatores etiológicos que contribuem para o desenvolvimento de NMSC.

Fonte: BHANDARI; PAI, 2014

Outros fatores de risco incluem: cor da pele (clara), idade (60 anos); gênero (masculino) (MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010); exposição crônica a agentes mutagênicos como por exemplo, raios X e gama (MOLHO-PESSACH; LOTEM, 2007), e exposição ao alcatrão, arsênico e Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (PIMPARKAR; BHAVE, 2010) processo irritativo crônico (OGDEN; TELFER, 2009), fatores genéticos (albinismo) e genodermatoses (BHANDARI; PAI, 2014).

Além disso, o estado de imunossupressão (EUVRARD; KANITAKIS; CLAUDY; 2003), traumas e queimaduras (WEENDON, 2003), infecções pelo Papilomavírus Humano (HPV) (BOUWES BAVINCK et al., 2010), dietas com baixa ingestão de gordura e baixo consumo de vitaminas (MALONEY, 1996;

DAVIES et al., 2002; GRANGER et al., 2006) são fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de tumores cutâneos.

No Brasil, a ceratose actínica é a doença de pele mais frequentemente diagnosticada pelos dermatologistas em pacientes do sexo masculino com mais de 40 anos (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2015). Estima-se que na Europa Ocidental 23% da população é diagnosticada com este tipo de lesão. Entretanto, na Austrália a ceratose actínica é bastante comum atingindo 60% dos indivíduos acima de 40 anos de idade (SMITS; MOOR, 2009). Segundo Cockerell (2000) CA e CEC representam a mesma lesão em diferentes estágios de evolução, considerando a ceratose actínica como o estágio mais precoce. Outros estudos computam que 20 a 25% dos casos de ceratose evoluem para carcinoma (DERGHAM et al., 2004).

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia (2015), o CEC é o segundo de tipo de câncer mais frequente, correspondendo 20% do total de tumores malignos registrados no Brasil. A ocorrência de CEC é maior em homens acima de 60 - 70 anos de idade (PETTER; HAUSTEIN, 2000). Estudos epidemiológicos relatam que desde 1960 a incidência global do carcinoma espinocelular aumenta anualmente. Presume-se que dois fatores estão relacionados ao aumento: alterações nos hábitos de exposição ao sol e a depleção na camada de ozônio. Apesar da baixa taxa de mortalidade do CEC, a sua morbidade é significativamente elevada, provocando incapacitação por desfiguramento (INCA, 2014). O carcinoma espinocelular tem comportamento biológico que permite, além da recorrência local, a ocorrência de metástases linfáticas e em órgãos à distância (SAMARASINGHE; MADAN; LEAR, 2011a).

No Brasil, o carcinoma basocelular é a mais frequente das neoplasias cutâneas, representando 70 a 80% do total de casos. A proporção de ocorrência na população é de quatro a cinco CBC's para cada CEC, e oito a dez para cada melanoma diagnosticado (CHINEM; MIOT, 2011). Sua ocorrência é mais comum em homens (após 40 anos de idade) do que em mulheres, numa proporção 2:1 (KOPKE; SCHMIDT, 2002). Os principais fatores de risco importantes para o desenvolvimento de CBC são: fotótipos claros, história familiar positiva de CBC (30-60%); sardas na infância, pele, olhos ou cabelos claros. Pessoas com peles claras têm risco dez a vinte vezes maior de desenvolver CBC do que peles escuras, mesmo quando vivem na mesma região (GREEN; BATTISTUTTA, 1990; SAHL et al., 1995; ROEWERT-HUBER et al., 2007; LEAR; DAHLKE; MURRAY, 2007). Entretanto, Nouri e colaboradores (2002) relataram casos de CBC em indivíduos de pele escura, incluindo descendentes africanos.

A prevenção do câncer de pele, inclusive os melanomas, inclui ações de prevenção primária, por meio de proteção contra luz solar, que são efetivas e de baixo custo. Em geral, as lesões possuem índices de cura superiores a 95% quando tratados precoce e corretamente (INCA, 2014).

Diversos tipos de tratamentos para os NMSCs têm sido descritos, como por exemplo, excisão cirúrgica, crioterapia, radiação ionizante, terapia fotodinâmica e quimioterapias tópicas. A escolha do tratamento depende, principalmente, do tipo de neoplasia, da preferência do paciente e do custo (BHANDARI; PAI, 2014).

2.1.1 Ceratose Actínica (CA)

O termo “ceratose actínica” significa crescimento ceratótico (espesso, escamoso) causado por um dano induzido por radiação eletromagnética, incluindo luz solar. Outras fontes de radiação, tais como fontes de luz artificial, incluindo camas de bronzamento, e radiação ultravioleta, podem causar o desenvolvimento deste tipo de lesão.

A ceratose actínica tem sido conceituada por dermatologistas como uma lesão pré-neoplásica com a proliferação de queratinócitos atípicos. Alguns pesquisadores afirmam que CA pode representar uma forma intra-epitelial do carcinoma de células escamosas mantidas sob vigilância imunológica do organismo, permanecendo estático ou regredindo espontaneamente (OGDEN; TELFER, 2009).

Histologicamente a ceratose actínica caracteriza-se por alterações epidérmicas de caráter atrófico e distrófico, associadas à degeneração hialina do colágeno da derme superficial subjacente. A camada espinhosa da pele é irregular, com zonas atróficas alternando com zonas hiperplásicas, e presença de várias depressões digitiformes. A superfície coberta por hiperceratose orto e paraceratósica é irregular, por vezes papilomatosa. As células da camada espinhosa, quer do corpo mucoso quer da camada basal, perdem gradualmente as suas características normais, ou seja, são de maior volume, tem citoplasma mais claro, núcleos irregulares e maior número de mitoses (KIRKHAM, 2009) (Figura 2).

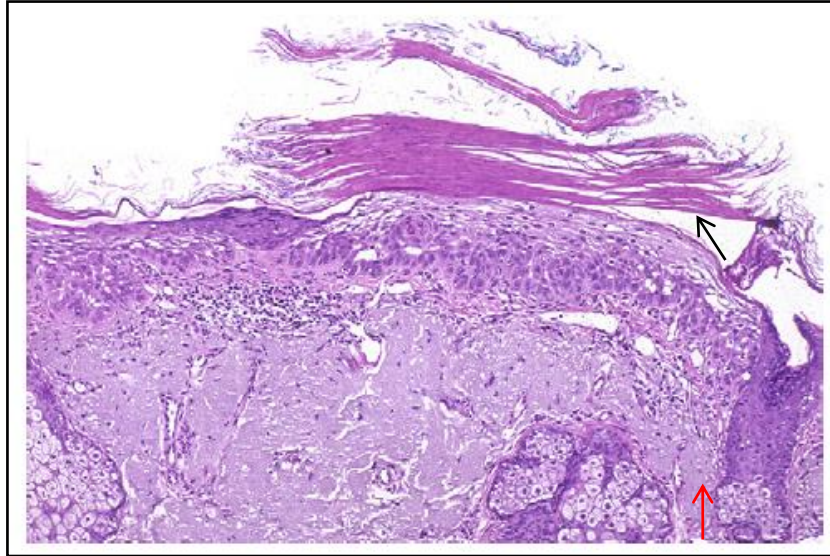


Figura 2. Imagem histológica da ceratose actínica (magnificação original 200x): presença de paraceratose (seta preta) e elastose solar da derme (seta vermelha). Presença de infiltrado inflamatório.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Manifesta-se, de início, por pequena mancha acastanhada de limites irregulares, mal marcados, plana ou ligeiramente saliente, de superfície lisa ou um pouco rugosa e ceratósica (Figura 3). Após alguns anos de evolução, a lesão espessa-se, infiltra-se, os bordos tornam-se mais elevados e nítidos, o centro erosiona-se ou cobre-se com espessa camada córnea (papiloma córneo) adquirindo as características dos carcinomas de células escamosas ou dos basocelulares (KIRKHAM, 2009).



Figura 3. Apresentação clínica da ceratose actínica.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

2.1.2 Ceratoacantoma (KA)

O termo ceratoacantoma foi primeiramente descrito como “úlceras crateriformes da face” por Sir Jonathan Hutchinson em 1889. O KA é um tumor cutâneo crateriforme derivado da bainha epitelial externa dos folículos pilosos, que pode ser confundido com o carcinoma espinocelular, entretanto caracteriza-se por ciclo evolutivo de crescimento rápido e regressão espontânea. Este tipo de tumor apresenta-se como lesão solitária ou múltiplas lesões, de forma esporádica ou em uma síndrome hereditária, ou ainda em associação com doenças inflamatórias. Histologicamente, pode ter características diferentes dependendo da apresentação clínica, e alguns tipos podem realizar metástase (KO, 2010).

Há três estágios na história natural dos ceratoacantomas: a fase proliferativa, a fase de maturidade e a fase involutiva.

Segundo Ricotti et al. (2009), na fase proliferativa (2 a 10 semanas), observa-se invaginação da epiderme atrofiada originando-se de folículos pilosos e preenchida por lâminas de queratina. Pode haver numerosas figuras de mitose e infiltrado inflamatório dérmico (Figura 4).

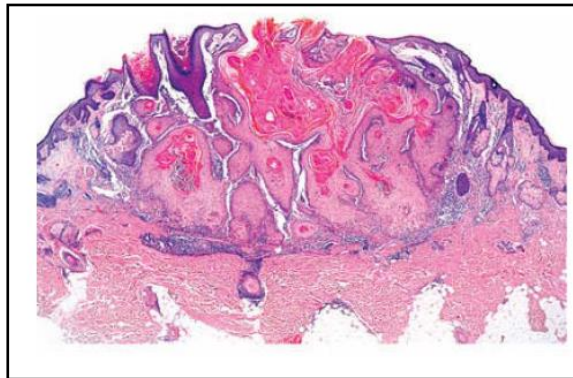


Figura 4. Imagem histológica da fase proliferativa do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).

Fonte: TAN e LEE, 2009.

Na fase de maturidade o ceratoacantoma apresenta depressão central crateriforme preenchida de queratina (ortoceratósica) e cuja abertura é bem limitada por um esporão formado pela invaginação da epiderme atrofiada que recobre lateralmente a massa tumoral. A diferenciação ceratósica é bem evidente, as mitoses e as anomalias nucleares são relativamente numerosas. Nesta fase, a queratinização das células escamosas é intensa resultando em aspecto eosinofílico pálido. A proliferação displásica não ultrapassa o nível das

glândulas sudoríparas. O infiltrado inflamatório do estroma é relativamente denso, linfocitário, com eosinófilos no início e posteriormente com plasmócitos (Figura 5) (BRENN; MCKEE, 2005).

A fase involutiva ocorre após 3 ou 4 meses e se caracteriza pela reabsorção do tumor e expulsão do plug central de queratina. A derme adjacente ao epitélio exibe aspecto de tecido de granulação seguido de fibrose (Figura 6). O mecanismo de regressão se deve à manutenção das relações entre a derme e os folículos pilosos (ciclo evolutivo dos pêlos) e a mecanismos imunológicos desencadeados pela reação proliferativa e displásica (BRENN; MCKEE, 2005).

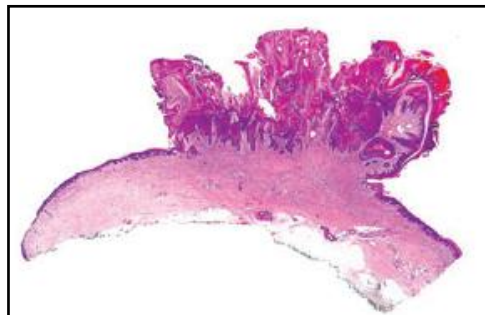


Figura 5. Imagem histológica da fase de maturidade do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).

Fonte: TAN e LEE, 2009.

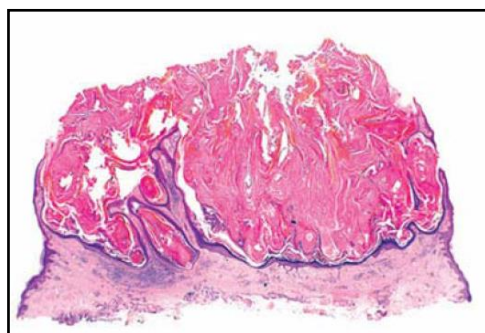


Figura 6. Imagem histológica da fase involutiva do Ceratoacantoma (magnificação original 100x).

Fonte: TAN e LEE, 2009.

A importância do conhecimento do ceratoacantoma reside no seu diagnóstico diferencial com o carcinoma espinocelular, tumor biologicamente maligno caracterizado pelo potencial de progressão e destruição tecidual. De modo geral, o exame clínico fornece elementos diferenciais: desenvolvimento rápido em 3 ou 4 semanas; características morfológicas típicas; ausência de infiltração profunda; tendência involutiva após o 3º ou 4º mês. Contudo, alguns casos, com aspectos clínicos e histológicos atípicos são de difícil diferenciação, levantando o problema de transformação carcinomatosa. Esta, embora rara, é possível, em especial nos ceratoacantomas múltiplos (TAN; LEE, 2009).

Apesar da semelhança entre as características celulares do KA e do CEC, a arquitetura do tumor pode funcionar como uma ferramenta valiosa na distinção das lesões. Outro fator importante a ser analisado na diferenciação é a capacidade de invasão dos tumores. Excisões de ceratoacantoma não estão associadas com elevado risco de comportamento agressivo. Entretanto a presença de invasão profunda é característica marcante do carcinoma de células escamosas. Quanto ao padrão macroscópico, os KAs tendem a ser tanto exofíticos quanto endofíticos com cratera central de queratina, enquanto o CEC é predominantemente endofítico apresentando frequente ulceração. A cratera é cercada por “lábios” epiteliais, os quais estão ausentes no CEC. Abscessos intraepidérmicos, com células acantolíticas e leucócitos polimorfonucleares são bastante comuns no KA e raramente vistos no carcinoma espinocelular (SCHWARTZ, 1994).

Ceratoacantoma inicia-se por pequena lesão ceratósica e saliente de crescimento rápido (3 a 4 semanas). São usualmente solitários, centrado por

zona arredondada hiperkeratósica, em forma de cúpula com nódulos rosa, de 0,5 a 2,0 cm de diâmetro (atingindo grandes dimensões), de limites nítidos e regulares (Figura 7) (KIRKHAM, 2009).



Figura 7. Ceratoacantoma com placas rosa, bordas elevadas e presença de úlcera crateriforme no centro da lesão.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Após 2 a 3 meses de evolução, inicia-se a fase involutiva, com aumento de diâmetro da zona central ceratósica, a massa córnea é eliminada, os bordos da lesão esbatem-se gradualmente. A cicatriz é ligeiramente deprimida, lisa, limitada por vezes por bordo filiforme que persiste. O tempo total de evolução espontânea é, em geral, de 3 a 6 meses (KIRKHAM, 2009).

O KA é geralmente solitário, mas múltiplas lesões podem ocorrer. Existem diversos tipos especiais morfológicos, dentre eles: KA centrífugo, KA gigante, KA subungueal, KA intraoral e de membranas mucosas, KA eruptivo generalizado e KA múltiplo (WEEDON, 2003).

2.1.3 Carcinoma de Células Escamosas (CEC)

O Carcinoma de Células Escamosas ou Carcinoma Espinocelular (CEC) é um tumor maligno que surge na epiderme através da proliferação descontrolada de queratinócitos transformados (DOOLEY et al., 2003; GARCIA- ZUAZAGA; OLBRICHT, 2008).

Existem múltiplos subtipos de CEC que diferem entre si quanto à histopatologia e ao prognóstico. Entretanto, a forma convencional do carcinoma espinocelular consiste em proliferação irregular e anárquica de queratinócitos atípicos, ricos em anomalias nucleares e mitoses. O CEC também apresenta acentuado componente estromal com invasão perineural, formação de pérolas de queratina e de pontes intercelulares (Figura 8). O tumor é formado por massas ou trabéculas de dimensões muito diversas, de limite mal marcado e em contato, mais ou menos extenso, com a superfície malpighiana, invadindo a derme (GURUDUTT; GEDEN, 2010).

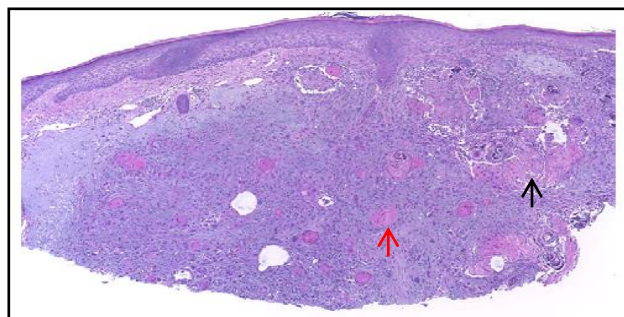


Figura 8. Imagem histológica do Carcinoma Invasivo de Células Escamosas (magnificação original 100x). Presença de células epiteliais escamosas que surgem na epiderme e estende-se profundamente na derme (seta preta). Nesta lesão observa-se a presença de pérolas córneas (seta vermelha).

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Todos os aspectos intermediários podem ser observados, entre as formas muito diferenciadas, ricas em pérolas de queratina, e as formas quase completamente indiferenciadas ou anaplásicas, as quais são dificilmente diferenciáveis das células conjuntivas. De modo geral, admite-se que quanto mais elevado for o grau de diferenciação melhor é o prognóstico (BHANDARI; PAI, 2014).

O CEC surge em regiões danificadas pelo sol, principalmente na cabeça e pescoço. Inicialmente, as lesões apresentam-se como pápulas vermelhas escamosas. Posteriormente, evoluem para placas ou nódulos firmes, lisos ou hiperkeratótico, com ulceração presente (Figura 9). Pacientes podem descrever essas lesões como feridas pruriginosas ou dolorosas, que saíram quando traumatizadas (ALAM; RATNER, 2001; GARCIA-ZUAZAGA; OLBRICHT, 2008).



Figura 9. Apresentação clínica do Carcinoma Cutâneo de Células Escamosas.

Fonte: GARCIA-ZUAZAGA; OLBRICHT, 2008.

2.1.4 Carcinoma de Células Basais (CBC)

O carcinoma de células basais ou carcinoma basocelular (CBC) é o tumor maligno cutâneo localmente invasivo com maior incidência em indivíduos de pele clara. As células neoplásicas originam-se de células epiteliais imaturas pluripotentes da camada basal da epiderme e mais raramente de partes do complexo cutâneo pilo-sebáceo ou outros apêndices cutâneos (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; WETZIG et al., 2009; SKELTON, 2009).

As diferentes variedades clínicas dos carcinomas basocelulares têm características citológicas e arquiteturais comuns, bastante típicas.

As células tumorais possuem citoplasma reduzido, mal limitado, com núcleo oval ou arredondado, muito basófilo com mitoses numerosas. A arquitetura do tumor resulta do modo de agrupamento das células em massas arredondadas ou alongadas e trabeculares, mais ou menos anastomosadas entre si, de dimensões variáveis, densas, muito basófilas, cujos limites são nítidos. Na periferia, as células tomam forma alongada, dispondo-se perpendicularmente à linha de delimitação, em paliçada, lembrando a camada basal epidérmica. As “ilhas” de células basalóides estão em contato com a epiderme suprajacente (Figura 10), ulcerada ou não, ou com a bainha epitelial externa dos folículos pilosos, ou ainda mostram-se dispersa na derme. Admite-se que os carcinomas basocelulares são tumores originados de células epiteliais imaturas pluripotentes da camada basal da epiderme. Deste modo, de acordo com a maior ou menor diferenciação celular, e conforme as relações entre o tecido epitelial e a derme circundante, observam-se diversas variedades histológicas. (CHINEM; MIOT, 2011).

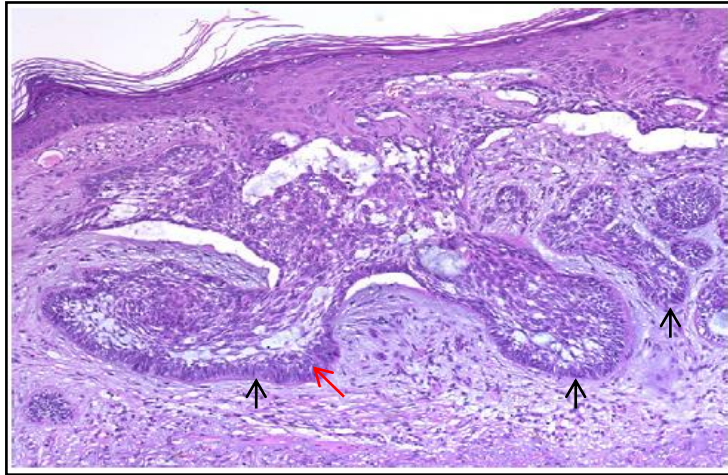


Figura 10. Imagem histológica do carcinoma basocelular padrão nodular (magnificação original 200x). Observa-se a presença de “ilhas” de células basalóides (setas pretas), com disposição em paliçada (seta vermelha) das células na periferia e arranjo desorganizado das células no interior do tumor.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

Os carcinomas basocelulares exibem vários subtipos diferentes que ocorrem em diferentes localizações anatômicas. Aproximadamente 80% dos casos ocorrem na cabeça e pescoço, e o restante no tronco e membros inferiores, principalmente em mulheres (BRENN; MCKEE, 2009).

A apresentação clínica mais comum é o carcinoma basocelular nodular, que inicialmente apresenta-se como pápula rósea perlácea crescendo progressivamente a nódulo, com posterior ulceração central, recoberta de crosta, ocorrendo sangramentos quando traumatizadas (Figura 11). As bordas geralmente são cilíndricas, translúcidas mostrando formações perláceas e eventualmente finas teleangiectasias (CARR; TAIBJEE; SANDERS, 2007).

O CBC é um tumor de crescimento lento, entretanto apresenta comportamento biológico agressivo e invasivo, e se negligenciado pode

espalhar-se profundamente causando grande destruição nos tecidos adjacentes, como músculo, cartilagem e osso (CHINEM; MIOT, 2011).



Figura11. Apresentação clínica do carcinoma de células basais. A lesão apresenta grande nódulo com ulceração central, aparência perolada e presença de teleangiectasia.

Fonte: RICOTTI et al., 2009.

2.2 Importância biológica dos carboidratos

Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas na natureza, e a maioria dos organismos sintetiza e metaboliza. A complexa heterogeneidade dos hidratos de carbono em sistemas vivos é o resultado direto de várias características: capacidade dos resíduos de açúcar formar ligações glicosídicas um com os outros, característica estrutural dessas moléculas, tipo de ligação anomérica, a posição e a ausência ou presença de ramificações (BERTOZZI; RABUKA, 2009).

É estimado que 50% de todas as proteínas das células dos mamíferos são glicosiladas em um determinado momento (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012). Deste modo, a glicosilação é uma das mais importantes modificações pós-traducionais (MPTs) das proteínas. A adição de carboidratos pode influenciar a carga, a conformação e a estabilidade das proteínas, conferindo heterogeneidade a biomoléculas, tendo como consequência direta o surgimento de várias glicoformas possíveis, ou seja, glicoformas heterogêneas da mesma proteína podem ter propriedades ou atividade biológica diferentes. Os glicanos ligados às proteínas são compostos por sete monossacarídeos diferentes (Figura 12), manose (Man), glicose (Glc), galactose (Gal), N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), fucose (Fuc) e ácidos siálicos (SA) ou ácidos neuramínicos (NeuNAc) (DWEK, 1996; LAZAR et al., 2011).

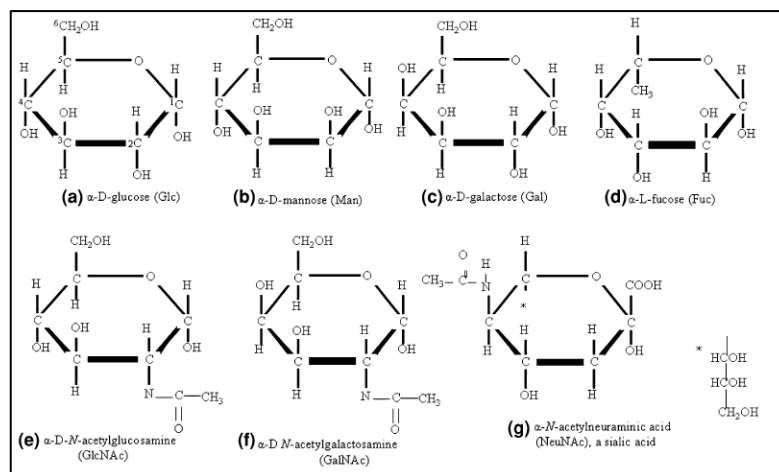


Figura 12. Estrutura dos setes monossacarídeos que compõem os glicanos ligados às proteínas.

Fonte: BROOKS, 2009.

Os glicoconjugados (Figura 13) são componentes estruturais dos receptores de proteínas que transmitem informações entre as células e o ambiente para controlar aspectos fundamentais do comportamento celular, e a variabilidade estrutural e complexidade desses glicanos de superfície celular permitem que os mesmos funcionem como moléculas de sinalização, reconhecimento e adesão celular (BROOKS, 2009).

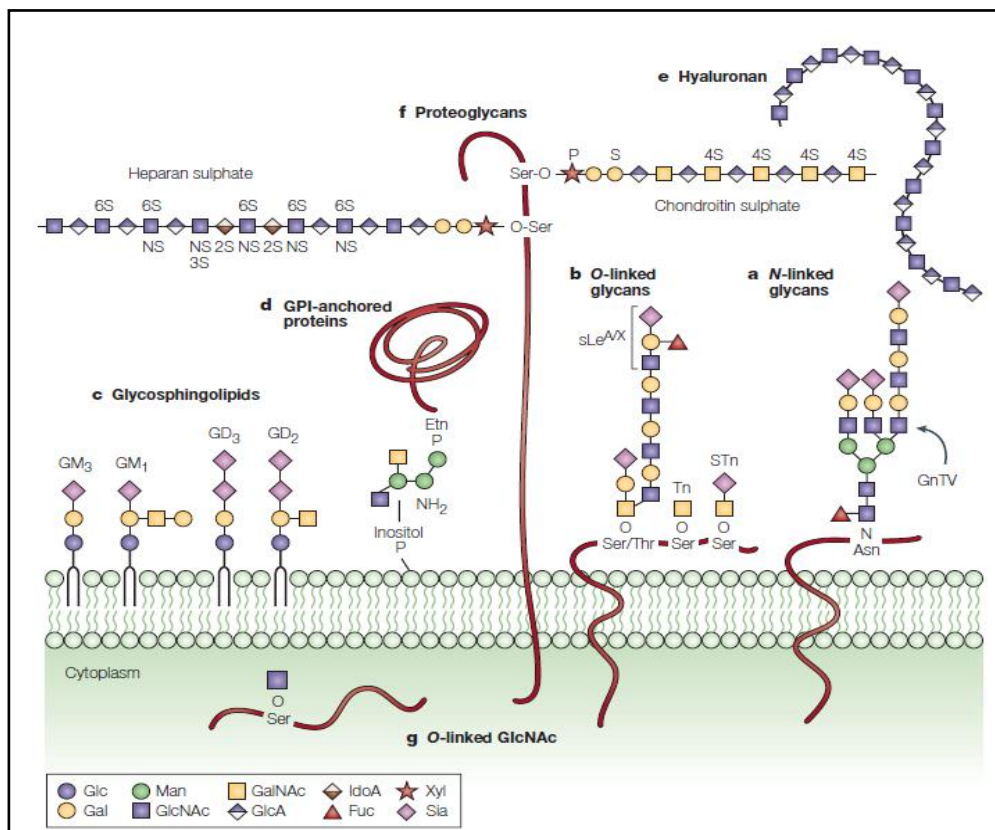


Figura 13. Principais carboidratos envolvidos em importantes funções fisiológicas.

Fonte: FUSTER; ESKO, 2005.

Os glicanos da superfície celular estão envolvidos em importantes funções fisiológicas, tais como, desenvolvimento embrionário normal, diferenciação e crescimento celular, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, interação patógeno-hospedeiro, reconhecimento imunológico, desenvolvimento

de doenças, metástase, tráfico, localização e degradação intracelular de biomoléculas e rigidez da membrana (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

A estrutura dos glicanos não depende apenas dos genes. Os níveis de glicosiltransferases e glicosidases no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, bem como a disponibilidade de substratos doadores no local determinam os padrões de glicosilação e lipídeos e proteínas (Figura 14). Os substratos doadores são derivados da glicose extracelular e da degradação dos glicoconjugados nos lisossomos, através da ação de glicosidases e outras enzimas, como por exemplo epimerases (VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2015). Portanto, alterações na expressão dessas enzimas pode desencadear uma cascata de eventos que estão envolvidos na transformação oncogênica das células (BLOMME et al., 2009).

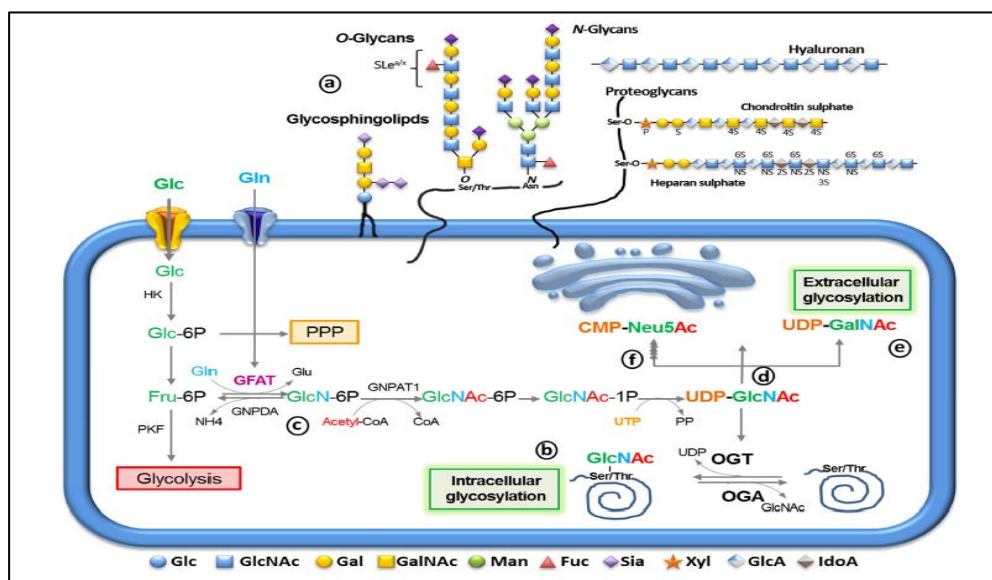


Figura 14. Síntese de glicoconjugados a partir da glicose através da via de biossíntese da hexosamina (HBP).

Fonte: VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2015.

2.3 Glicosilação e Câncer

Todos os tipos de células malignas demonstraram alterações em seus padrões de glicosilação quando comparados às células normais (POWLESLAND et al., 2009). As células tumorais têm alterado o metabolismo da glicose, produzindo ATP através da glicólise mesmo sob condição normóxica e, deste modo, aumentando a absorção do carboidrato aproximadamente dez vezes mais do que o tecido normal adjacente afim de sustentar um metabolismo altamente exigente. Este desvio metabólico foi denominado “Efeito Warburg”, e é crítico para manutenção do fenótipo maligno (WARBURG, 1956). A alta taxa de fluxo glicolítico é uma característica metabólica central dos tumores, influencia a expressão dos transportadores de glicose (Glut) (CARVALHO et al., 2011).

No microambiente do tumor, alterações na estrutura e/ou distribuição dos carboidratos permitem que as células neoplásicas interfiram em alguns eventos que propiciam a invasão e disseminação de células tumorais pelo organismo (metástase), angiogênese e silenciamento do sistema imune, tais como, ativação de receptores, adesão e motilidade celular (FUSTER; ESKO, 2005).

Vários carboidratos são reconhecidos como mediadores de eventos fisiopatológicos durante as etapas de progressão do tumor (Figura 15). A progressão tumoral envolve uma série de alterações na sinalização intracelular e intercelular, que promovem a desregulação do ciclo celular e facilitam a proliferação para promover o surgimento de um subconjunto de células invasoras que se dissociam do tumor, digerem a membrana basal e a matriz extracelular e migram para outras regiões. As células tumorais que se dissociam formam uma rede neovascular de células endoteliais do hospedeiro

(angiogênese), se aderem a plaquetas, leucócitos ou a células endoteliais dos vasos sanguíneos ou linfáticos para facilitar a evasão do sistema imune inato. Finalmente, uma célula remanescente invade, neovasculariza e se prolifera em um novo tecido (FUSTER; ESKO, 2005).

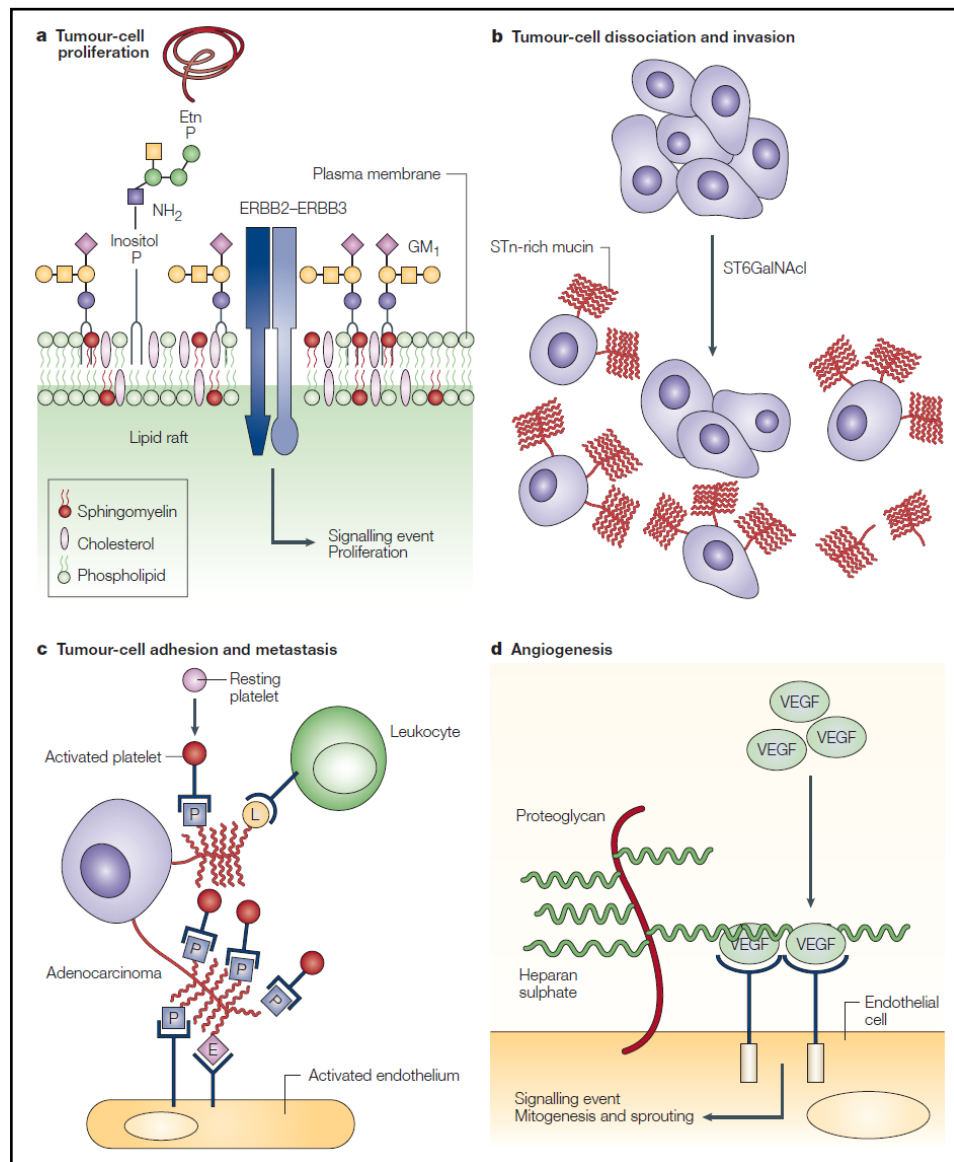


Figura 15. Representação esquemática dos carboidratos que participam dos principais eventos fisiopatológicos durante a progressão do tumor.

Fonte: FUSTER; ESKO, 2005.

Girnitá e colaboradores (2000) observaram que o tratamento de células neoplásicas do melanoma e do sarcoma com inibidores da N-glicosilação *in vitro* inibiu o crescimento de tumores dependentes da sinalização pelo receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF 1R). A N-glicosilação do IGF 1R é necessária para fosforilação e translocação desta proteína na superfície celular, e o subsequente crescimento e sobrevivência das células neoplásicas.

Inibidores de pequenas molécula da via glicolítica e 2-deoxi-D-glicose (2-DG), análogo estável da glicose e inibidor da hexoquinase (enzima chave da via glicolítica), têm sido utilizados como fármacos para o tratamento de células tumorais (PELICANO et al., 2006; JUNG et al., 2013; LI et al., 2013; DATTA et al., 2013; MULEY; OLINGER; TUMMALA, 2015).

Smetana et al. (2003) reportaram que laminina, principal componente da membrana basal, exibem epítomos sacarídicos únicos (oligossacarídeos ricos em manose). Portanto, a alteração na expressão de α -D-glicose/manose nesta proteína pode modificar as interações adesivas entre células transformadas, contribuindo para desprendimento das células cancerosas do tumor primário, motilidade e aquisição de um fenótipo invasivo.

Várias mudanças estruturais comuns ocorrem em glicanos tumorais e podem afetar as interações entre os glicanos de superfície celular do tumor com as lectinas endógenas, os quais podem determinar o potencial metastático das células neoplásicas, incluindo aumento no nível de ramificação das estruturas, bem como o aumento na expressão de sequências terminais incomuns (KIM; VARKI, 1997). Estas mudanças frequentemente resultam no aumento da exposição de resíduos de galactose terminais, tais como aqueles

encontrados no antígeno T câncer-associado (Gal β 1-3 GalNAc) e o trissacarídeos Lewis X (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) (POWLESLAND et al., 2009).

Dentre as inúmeras técnicas existentes para análise da mudança na composição de glicanos, as lectinas funcionam como eficientes ferramentas para detecção e análise de carboidratos devido a sua elevada especificidade da interação lectina-carboidrato (BROOKS, 2009).

2.4 Lectinas e suas interações com os carboidratos

Lectinas, geralmente derivadas de plantas, demonstraram ser muito eficiente para detectar glicosilação aberrante em células (AUDFRAY et al., 2015). Estas proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou a oligossacarídeos de forma reversível, sendo frequentemente encontradas na superfície celular ou em partículas intracelulares (SHARON; LIS, 1989; MODY; JOSHI; CHANEY, 1995; MINKO, 2004; SHARON; LIS, 2004; BOUCKAERT et al., 2005; RABINOVICH et al., 2007). Estas moléculas contêm dois ou mais sítios de ligação a açúcares e podem aglutinar células e/ou precipitar complexos de carboidratos conjugados a proteínas e lipídeos (MODY; JOSHI; CHANEY, 1995).

O termo lectina é derivado da palavra *legere*, cujo significado em latim é “escolher” ou “selecionar”. Os estudos sobre lectinas foram iniciados em 1888, quando Herrmann Stillmark descreveu a capacidade de aglutinação da ricina (VARKI et al., 2009). Essas proteínas foram inicialmente encontradas e

descritas em plantas, e posteriormente isoladas de microrganismos e animais (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas funcionam como mediadores da transferência de informações em sistemas biológicos, exercendo suas funções através da interação com glicoproteínas, glicolipídeos e oligossacarídeos (Figura 16) (NILSSON, 2007). Este grupo de proteínas pode ser encontrado em diferentes compartimentos celulares dos organismos, e a sua localização reflete a sua diversidade de função. Lectinas endógenas participam de vários processos biológicos, tais como, reconhecimento célula-célula, interações célula-matriz extracelular, fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação, sinalização, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação patógeno-hospedeiro, dobramento e endereçamento de glicoproteínas, indução mitogênica e homeostase (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

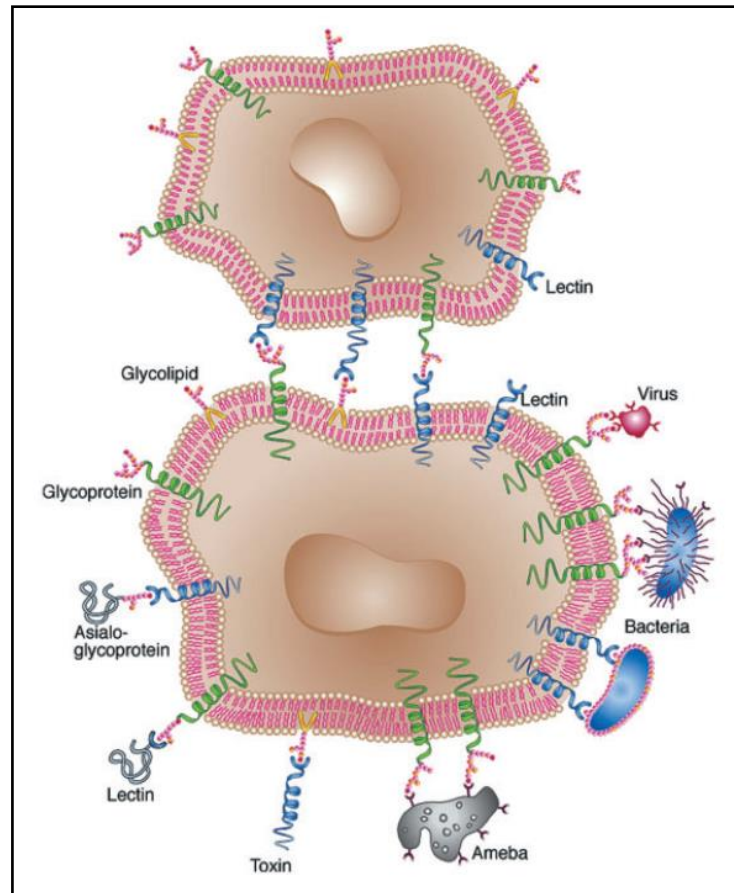


Figura 16. Interações de superfície celular lectina-carboidratos.

Fonte: SHARON; LIS, 2004.

As sequências de aminoácidos de várias lectinas e as estruturas tridimensionais das mesmas têm sido elucidadas. Isto torna possível substituir a tradicional divisão de lectinas de acordo com a sua origem, ou seja, plantas animais e microorganismos, por uma classificação baseada em características estruturais comuns. A maioria das lectinas pode ser classificada em três grupos: simples, mosaico (multidomínio) e complexos macromoleculares. Dentro de cada classe, as lectinas podem ser agrupadas em famílias distintas com sequências semelhantes e propriedades estruturais (LIS; SHARON, 1998).

Lectinas simples possuem um pequeno número de subunidades, não necessariamente idênticas, de baixo peso molecular (abaixo de 40 KDa), as quais podem conter um domínio adicional além do sítio de ligação ao carboidrato. Cada monômero é constituído β -folha antiparalelas ligadas por loops curtos e voltas, e desprovido de qualquer estrutura helicoidal. Esta categoria inclui praticamente todas as lectinas de vegetais conhecidas, bem como as galectinas (Figura 17), uma família de lectinas de origem animal que reconhece especificamente resíduos de galactose (LIS; SHARON, 1998; ETZLER; SUROLIA; CUMMINGS, 2009).

No grupo mosaico (multidomínio) estão incluídas diversas proteínas de diferentes fontes: hemaglutininas virais e as lectinas animais tipo C, P, I (Figura 17). Possuem uma ampla faixa de pesos moleculares, que consistem de vários tipos de módulos de proteínas ou domínios, e apenas um deles possui o sítio de ligação ao carboidrato. A maioria dessas lectinas é monovalente, entretanto, quando inseridas em membranas, agem de forma multivalente. As lectinas tipo-C são nomeadas assim porque precisam de Ca^{2+} no sítio de ligação para reconhecer os carboidratos. Pertencem a este grupo mais de 50 proteínas, todas caracterizadas por um domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD) composto por 115-130 aminoácidos, dos quais 14 são invariantes e 18 são altamente conservados. As lectinas incluídas neste grupo foram agrupadas em três famílias: lectinas endocíticas, colectinas e selectinas (LIS; SHARON, 1998; CUMMINGS; MCEVER, 2009).

O CRD tipo P foi encontrado apenas em dois tipos de lectinas: receptores de manose-6-fosfato, um de alto peso molecular (300 KDa) e não necessitam de cátions para a sua atividade e outro de baixo peso molecular (45 KDa) cuja

atividade é Ca^{2+} dependente. Ambas são glicoproteínas transmembranas (VARKI; KORNFIELD, 2009).

Lectinas tipo-I são caracterizadas por possuírem números variados de domínios celulares semelhantes à imunoglobulina. Portanto, são membros da superfamília das imunoglobulinas. A mais importante e melhor lectina caracterizada é a sialoadesinas, família de glicoproteínas que reconhece especificamente resíduos de ácido siálico e possuem domínio extracelular semelhante à região variável das imunoglobulinas. Estas proteínas estão presentes na superfície de macrófagos, linfócitos e células mielóides (VARKI; CROCKER, 2009).

As lectinas do tipo-R pertencem à superfamília de proteínas as quais contêm um CRD estruturalmente semelhante ao da ricina. Estas lectinas estão presentes em animais, bactérias e plantas, as quais contêm uma subunidade separada (toxina potente) (CUMMINGS; ETZLER, 2009).

Os complexos macromoleculares são encontrados em bactérias, geralmente sob a forma de fímbrias (ou pili), organelas filamentosas heteropolimérica presentes na superfície bacteriana. O “tronco” do filamento fimbrial é composto de unidades protéicas que desempenham um papel estrutural. Apenas uma subunidade destas proteínas possui o sítio de ligação ao carboidrato responsável pela atividade e especificidade ao açúcar das fímbrias, por exemplo para manose (fímbria tipo I) ou galabiose (fímbria P) (GAASTRA, 1996; LIS; SHARON, 1998).

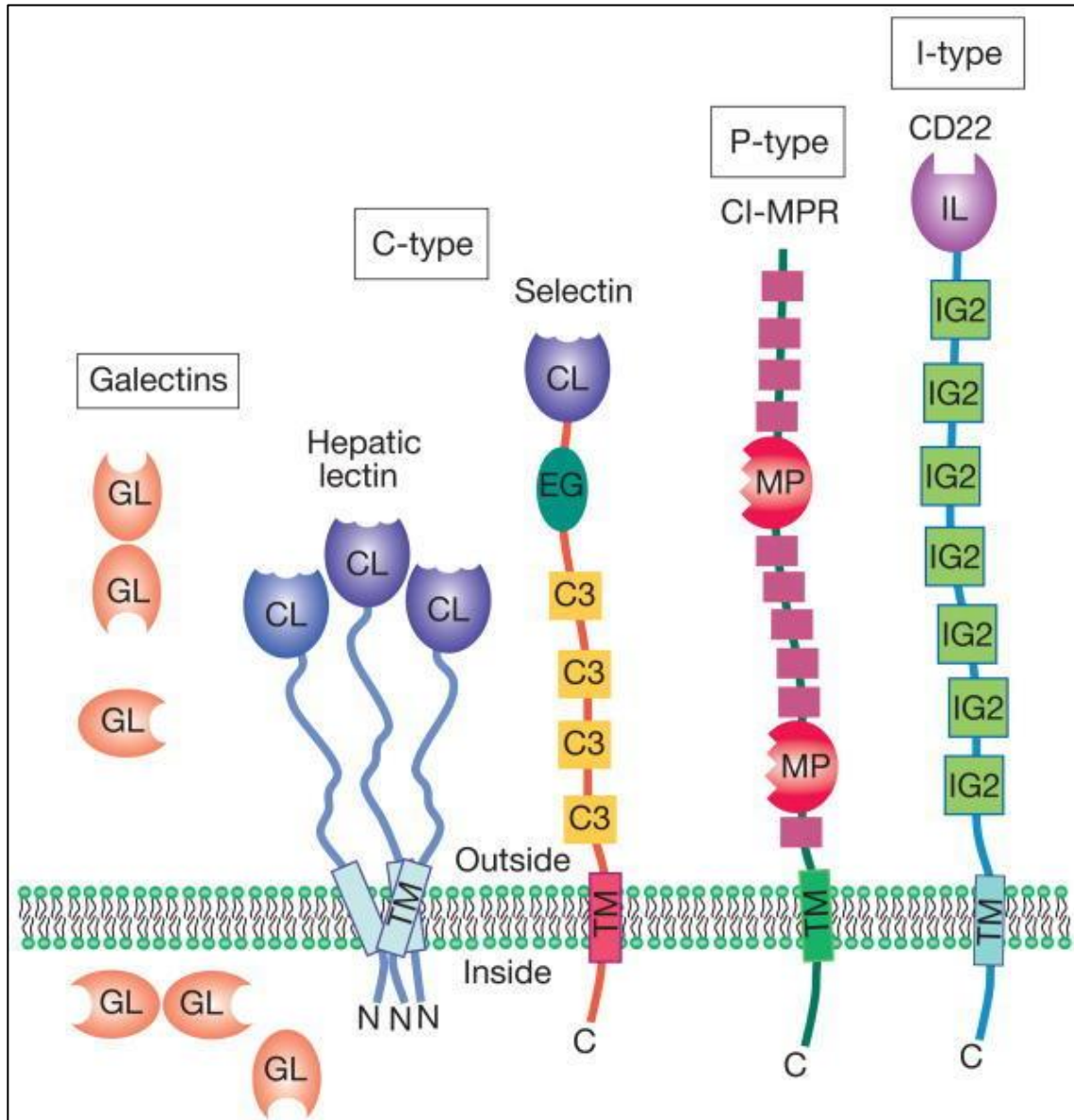


Figura 17. Exemplos esquemáticos dos principais tipos de lectinas animais, com base na estrutura da proteína.

Fonte: VARKI et al., 2009.

Além disso, essas proteínas podem também ser classificadas de acordo com a quantidade de CRD que possuem (Figura 18); merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e multilectinas. As merolectinas possuem apenas

um sítio de ligação a carboidrato e, portanto, são incapazes de aglutinar células. As hololectinas (maioria das lectinas) são compostas por dois ou mais sítios de ligação a açúcares idênticos, e possuem a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas são constituídas de sítios ligantes a carboidratos e outro sítio com atividade catalítica ou biológica diferente que reagem independentemente do domínio ligante a açúcares. As multilectinas possuem sítios de ligação a carboidrato idênticos, mas com especificidades diferentes (PEWMANS E VAN DAMME, 1995)

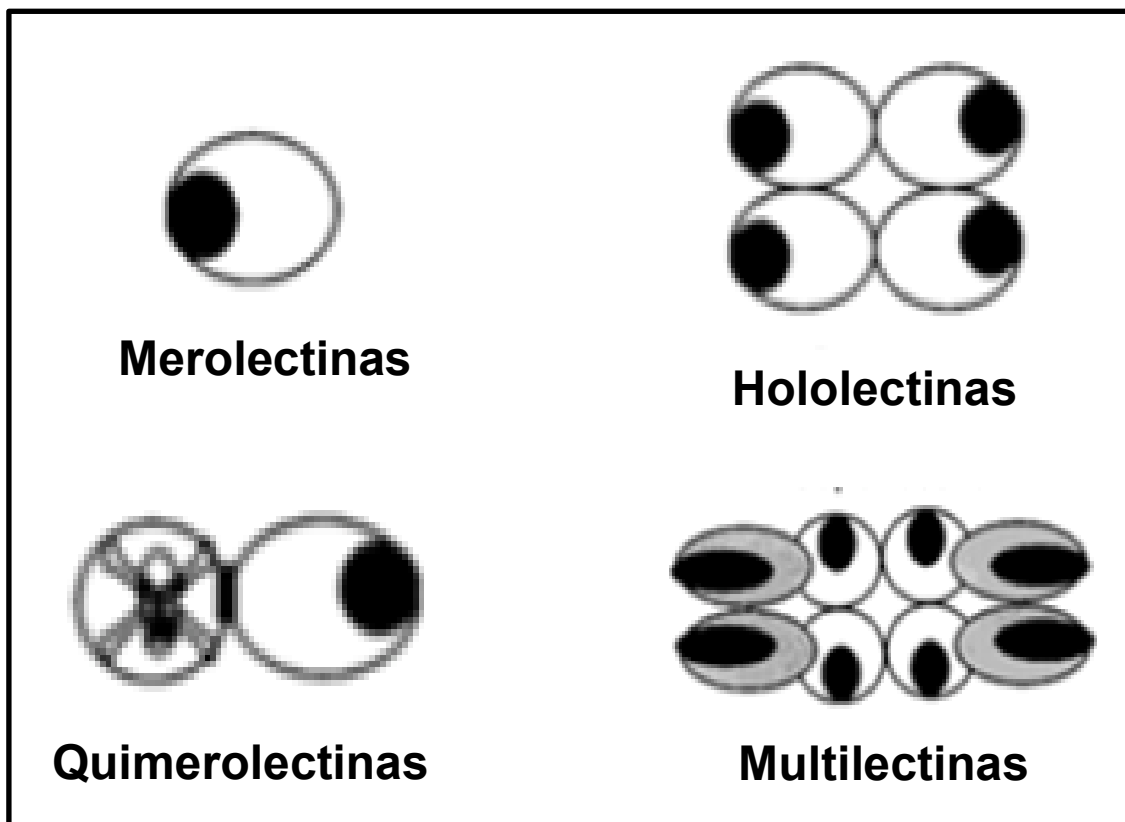


Figura 18. Classificação das lectinas de acordo com a quantidade de CDR.

Fonte: BRUSTEIN, 2007

Nas últimas décadas, a interação entre lectinas e carboidratos tem sido o foco de inúmeros estudos devido ao papel fundamental que ela desempenha nos processos biológicos citados acima. Por muito tempo, o advento do dogma central da biologia molecular e a investigação de sequências de peptídeos, proteínas, DNA e outras interações foram o objetivo de estudos da comunidade científica. Todavia, os carboidratos possuem um elevado potencial para armazenar ou transcrever informações tanto quanto os nucleotídeos e os aminoácidos. Isso se deve ao fato de que os açúcares assumem muitas conformações monoméricas (VARKI et al., 2009).

As interações entre os glicanos (oligo, mono e polissacarídeos) e as lectinas são estabelecidas por meio do CRD, os quais são “rasos” e pré-formados, uma vez que poucas mudanças conformacionais ocorrem após a ligação entre as moléculas (WEIS; DRICKAMAR, 1996). As interações entre os carboidratos e as lectinas são semelhantes às interações estabelecidas por antígenos e anticorpos, ou seja, fracas (constantes de dissociação na faixa de milimolar), seletivas, reversíveis e ocorrem sem que haja reação química. (JEYAPRAKASH et al., 2003). Isto se faz necessário para a participação destas proteínas nos mecanismos biológicos. Entretanto, algumas lectinas são capazes de reconhecer glicanos com alta afinidade (constantes de dissociação na faixa de nanomolar) (VARKI et al., 2009).

Como citado anteriormente, uma única lectina pode reconhecer diferentes carboidratos, por exemplo, certas variações na posição C-2 do anel piranosídeo podem ser toleradas, resultando na interação de lectinas glicose-específica com a manose, e na interação de lectinas galactose-específica com N-acetilglicosamina (PEI, 2006).

Já se tem o conhecimento de que lectinas se ligam a carboidratos através de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxil dos carboidratos e os resíduos dos aminoácidos polares (Figura 19). As interações proteína-carboidrato são frequentemente mediadas por íons metálicos presentes em seus sítios de ligação específicos para carboidratos, tais como cálcio, zinco e magnésio. Estes íons formam pontes entre os átomos de oxigênio das hidroxilas dos carboidratos e os resíduos carregados negativamente das lectinas. As posições das faces apolares dos carboidratos e os resíduos dos aminoácidos aromáticos encontrados na estrutura do complexo proteína-carboidrato indicam outro tipo de contato classificado como interações hidrofóbicas ou de van der Waals (WIMMEROVÁ et al., 2012).

O complexo lectina-carboidrato não possui uma única conformação estrutural. Uma vez formado, as posições das moléculas podem mudar, isto é, o carboidrato pode se mover dentro do CRD, as cadeias secundárias dos carboidratos podem rotacionar e também, o carboidrato pode eventualmente deixar o sítio de ligação e interagir com outras partes da proteína (LIS; SHARON, 1998).

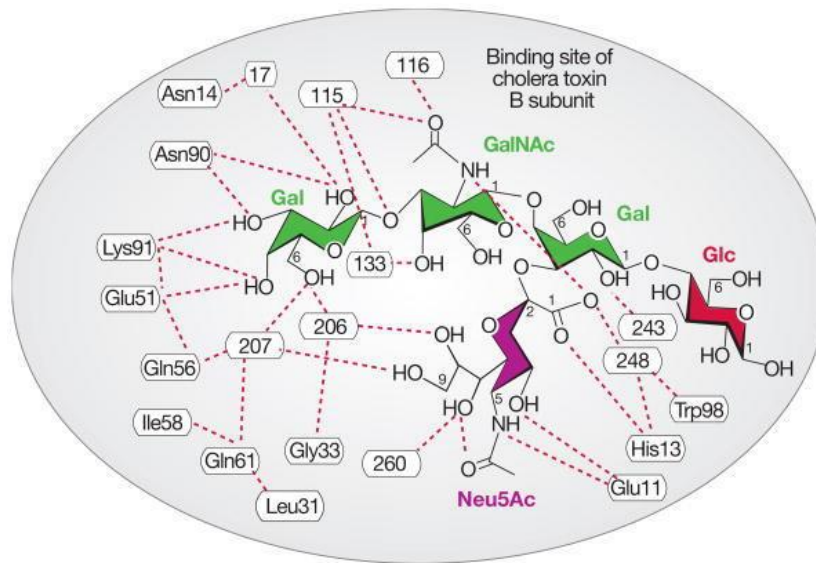


Figura 19. Interação dos monossacarídeos do gangliosídeo GM1 ligado à subunidade B da toxina da cólera.

Fonte: VARKI et al., 2009.

Ensaio imunoenzimático (ELISA – “enzyme-linked immunosorbant assay”) são métodos utilizados para monitorar a especificidade das lectinas por carboidratos. Esses ensaios utilizam mono, oligossacarídeos ou glicoconjugados, com o objetivo de avaliar qual deles apresenta maior afinidade pela lectina. Entretanto, o uso de técnicas capazes de monitorar diretamente a interação lectina-carboidrato, como interferometria de polarização (RICARD-BLUM et al., 2006), ensaio de lectina ligado a enzima (ELLAs) (WU et al., 2006), espectroscopia de impedância (La BELLE et al., 2007), microbalança de cristal de quartzo (QCM) (SHEN et al., 2007), técnicas de microarray (LIANG et al., 2007), ressonância plasmônica de superfície (SPR) (LINMAN et al., 2008), raio-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) (ARDÁ et al., 2011), têm sido amplamente

divulgadas como modelo nos estudos de interações moleculares. Polissacarídeos ou monossacarídeos terminais presentes em glicoconjugados interagem com os sítios de ligação ao carboidrato das lectinas com maior avidéz. Constantes de afinidade para essas moléculas são mil vezes maiores do que as observadas para monossacarídeos (LIS; SHARON, 1998).

2.4.1 Concanavalina A (Con A)

Con A é uma lectina de origem vegetal, obtida das sementes de *Canavalia ensiformes* (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae) que se liga especificamente às unidades de α -D-manose/glicose de carboidratos complexos. Sua estrutura molecular, reportada por Sanders e colaboradores (2001), é composta por duas subunidades idênticas de 237 resíduos de aminoácidos de 25,5 KDa cada uma (Figura 20). Ela se apresenta como dímero em pH 4,5 a 6,0, e em pH maior que 7,0, é predominantemente um tetrâmero (DAM; BREWER, 2002).

O reconhecimento dos carboidratos pela Con A ocorre através de ligações do tipo pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos de aminoácidos apolares Asn14, Arg228, Try100 e Asp208 e os átomos de oxigênio do anel glicosídico, formando o chamado “cluster effect”. Além disso, para a molécula de Con A se ligar aos resíduos de carboidratos, dois íons metálicos, Mn^{2+} e Ca^{2+} , devem estar presentes no meio. Cada íon Mn^{2+} está coordenado aos resíduos Glu8, His24, Asp10 e Asp19 da unidade monomérica da lectina, e duas moléculas de água, enquanto o Ca^{2+} está coordenado aos resíduos

Asp10, Asp19, Try12 e Arg228, e mais duas moléculas de água (LORIS et al., 1998; SANDERS et al., 2001).

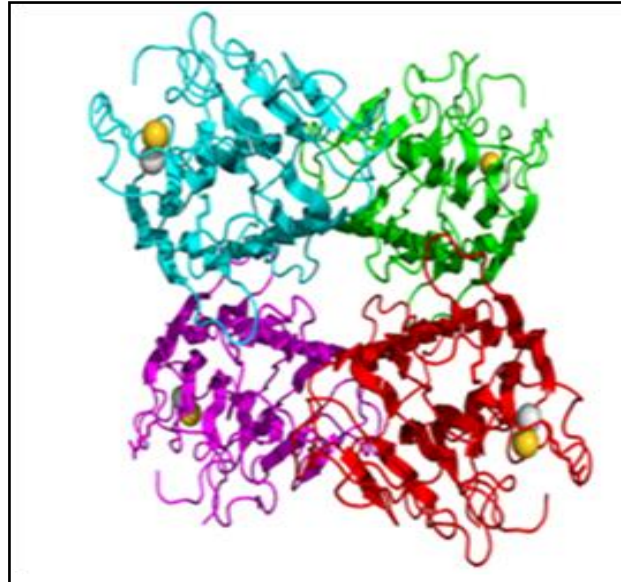


Figura 20. Diagrama esquemático da estrutura tetramérica da Con A no qual se observam os quatro sítios de ligação para carboidratos.

Fonte: LORIS et al., 1998.

2.4.2 Wheat germ aglutinina (WGA)

WGA, membro da família dos cereais obtida do *Triticum vulgaris* (trigo), é uma mistura de três isolectinas (WGA 1, WGA 2 e WGA 3), produto de diferentes genes, que diferem levemente na composição dos seus aminoácidos (SCHWEFEL et al., 2010). A proteína fisiologicamente ativa é um homodímero de duas subunidades idênticas de 36 kDa desprovidos de metais que se associam em um modelo “cabeça-cauda” (Figura 21). Cada subunidade é constituída de quatro subdomínios homólogos (A a D) de 43 aminoácidos, os domínios são similarmente enovelados com quatro pontes dissulfeto

posicionadas de maneira idêntica, tornando a molécula altamente estável. A WGA exibe especificidade para dois tipos de açúcares N-acetilados, N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) e N-acetil-ácido neuramínico (NeuNAc) (LIS;SHARON, 1998; SCHWEFEL et al., 2010).

Como ilustrado na figura 21, a partir de estudos com cristais de mono-, di- e trissacarídeos, dois sítios/subunidades de ligação a carboidratos independentes têm sido identificados nas regiões de contato dos domínios dos monômeros opostos 1 e 2 (B1/C2 ou B2/C1, D1/A2 ou D2/A1). Um dos domínios participantes age como “principal” (pr) domínio de ligação e o outro como domínio “auxiliar” (hl) (B1(pr)/C2 (hl) e D1 (pr)/A2 (hl), etc). O domínio “pr” proporciona numerosos contatos com o sacarídeo ligado através de três resíduos de aminoácidos aromáticos nas posições 21, 23 e 30, e uma serina na posição 19 do domínio. O domínio “hl” contribui com um grupo carboxil, preferencialmente um glutamato, na posição 29 (SCHWEFEL et al., 2010).

WGA tem sido utilizada como uma importante ferramenta para o estudo de ativação de plaqueta (RENDU; LEBRET, 1984), transporte de glicose (YANG et al., 2000), fertilização (OKUMURA et al., 2012), inibição do crescimento celular (EBERT et al., 2009) e glicobiologia do câncer (RÊGO et al., 2013a).

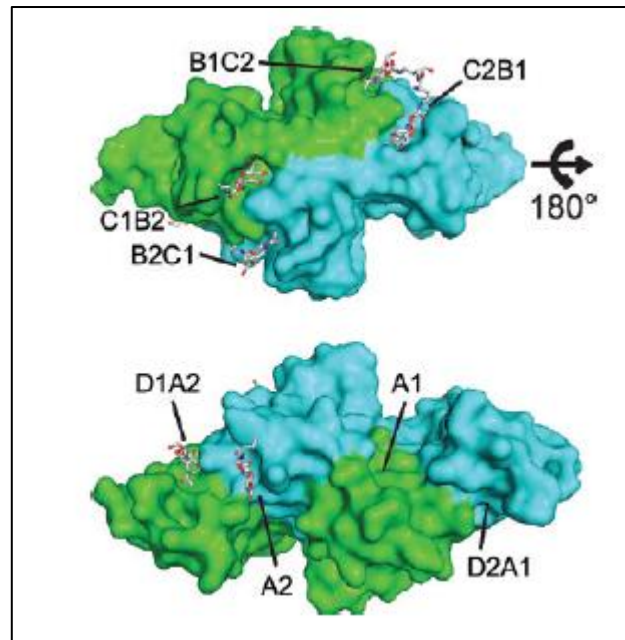


Figura 21. Estrutura cristalina da isoforma 1 da lectina dimérica WGA. Cadeia polipeptídica 1 em verde e a 2 em ciano.

Fonte: SCHWEFEL et al., 2010.

1.4.3 Peanut agglutinin (PNA)

O nome “peanut agglutinin” foi originado a partir da sua habilidade em aglutinar linfócitos T e hemácias tratadas com a enzima neuraminidase (RAVISHANKAR et al., 2001). PNA, lectina isolada do amendoim *Arachis hypogaea*, possui especificidade pela sequência Gal- β (1-3)-GalNAc e apresenta estrutura homotetramérica (Figura 22) com quatro monômeros idênticos de ligação a carboidratos com peso molecular de 110 kDa e constituída por 236 resíduos de aminoácidos. Cada subunidade é constituída por estruturas em folhas- β interconectadas por alças de comprimento variável (BANERJEE et al., 1996; NATCHIAR et al., 2006). O principal núcleo hidrofóbico das subunidades está entre as duas principais folhas- β . Existe um núcleo hidrofóbico secundário entre a superfície côncava dobrada. O local de

ligação ao açúcar é composto por 4 alças localizadas no topo da dobra. Como em toda lectina derivada de legumes, os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} estão envolvidos na orientação dos grupos que interagem com o carboidrato (NATCHIAR et al., 2006).

PNA tem sido utilizada na triagem de células progenitoras do timo e detecção de células malignas (ADHIKARI et al., 2001), na identificação de grupos sanguíneos (KHAN et al., 2002), em sistemas de nanocarreadores específicos de drogas (DAL BÓ et al., 2014) e na avaliação do glicofenótipo de tumores mamários (CAMPOS et al., 2006; BRUSTEIN et al., 2012), cutâneos (LIMA et al., 2013) e prostáticos (SILVA et al., 2014).

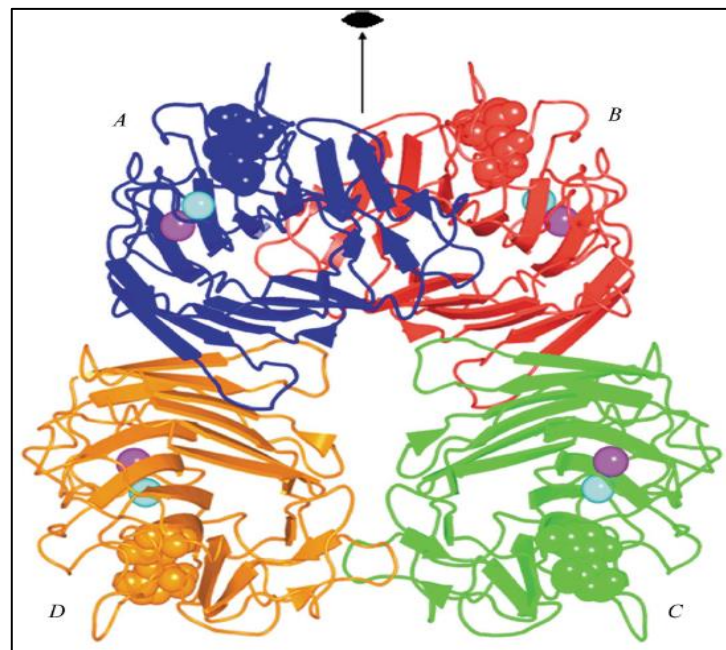


Figura 22. Representação da estrutura tridimensional da PNA ligada à sequência sequência Gal-β(1-3)-GalNAc por interações de van der Waals. As quatro subunidades estão indicadas por A, B, C e D. As esferas magenta e ciano representam os íons Mn^{2+} e Ca^{2+} , respectivamente.

Fonte: NATCHIAR et al., 2006.

1.4.4 *Ulex europaeus* aglutinina-I (UEA-I)

A lectina UEA-I reconhece especificamente resíduos de α -L-fucose e oligossacarídeos que contêm fucose, como por exemplo, α -L-Fuc (1 $\rightarrow$ 2) β -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4) β -D-GlcNAc (CAZAL; LALAURIE, 1952), e forma um homotetrâmero (Figura 22) com peso molecular 63 KDa (MEISSNER et al., 1995). Trabalhos comprovaram que a isoforma UEA-I se liga às células do epitélio olfativo e nasal (HOLMES et al., 1985; TUORI; VIRTANEN; UUSITALO, 1994), córneoconjuntival (HASSID et al., 1997; MALZ; SCHWARTZ; KUHN, 1999), do trato digestivo e às células M da placa de Peyer (CLARK et al., 1995; KESSIMIAN et al., 1986; SHARMA; SCHUMACHER; ADAM, 1998), na membrana celular de células do carcinoma mucoepidermóide de glândula parótida (SOBRAL et al., 2010) e aos tumores derivados de células endoteliais e epiteliais (MIETTINEN et al., 1983), células de tumores cutâneos (LIMA et al., 2013) e de tumores mamários (ANDRADE et al., 2013).

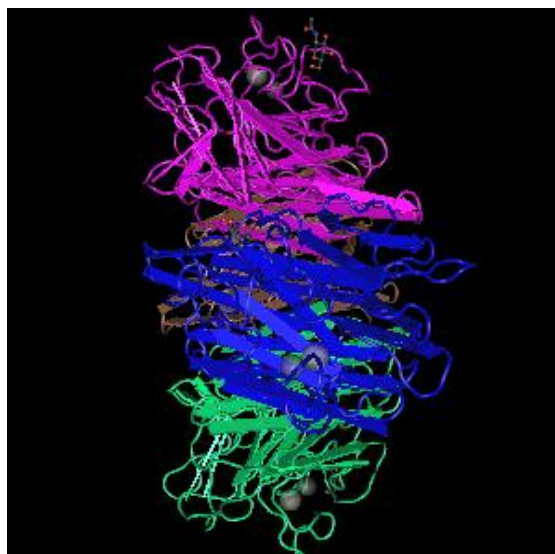


Figura 23. Representação da estrutura tridimensional da UEA.

Fonte: LORIS et al., 2000.

1.4.5 *Maackia amurensis* aglutinina (MAA)

A presença de um composto com atividade hemaglutinante nas sementes de *Maackia amurensis* foi descrito em 1960 por Boyd e colaboradores. Duas isolectinas foram purificadas e denominadas hemaglutinina (MAH) e leucoaglutinina (MAL), refletindo suas específicas atividades de aglutinação para diferentes tipos de células sanguíneas. MAL apresentou forte especificidade para as cadeias de carboidratos contendo ácido siálico, particularmente para a sequência $\alpha\text{NeuAc}(2-3)\beta\text{Gal}(1-4)\beta\text{GlcNAc}/\text{Glc}$. A unidade assimétrica contém duas subunidades (A e B) com 258 aminoácidos. Cada monômero se dobra em duas folhas- β e depois se associam para formar um dímero com 74 KDa (34 e 35 KDa cada monômero), caracterizado por uma grande cadeia folha- β resultante do ponto de encontro da parte anterior de duas folhas. Quando em solução, os dímeros se reúnem e formam um tetrâmero (Figura 23). Os dois dímeros interagem através da sua parte externa e, como resultado, gera um grande canal no meio do tetrâmero (YAMAMOTO; KONAMI; IRIMURA, 1997; IMBERTY et al., 2000).

MAA mostrou ser uma potente sonda para avaliação do glicofenótipo de tumores cutâneos (LIMA et al., 2013) e mamários (BADR et al., 2013), de polipos nasais de pacientes com fibrose cística (HASSID et al., 2000), de câncer de pulmão de células não-pequenas (MEHTA et al., 2013) e para detecção de receptores do vírus influenza em camundongos (NING et al., 2009). Além disso, atua como importante agente indutor de apoptose em células de câncer de pulmão de células não-pequenas (LALLI et al., 2015).

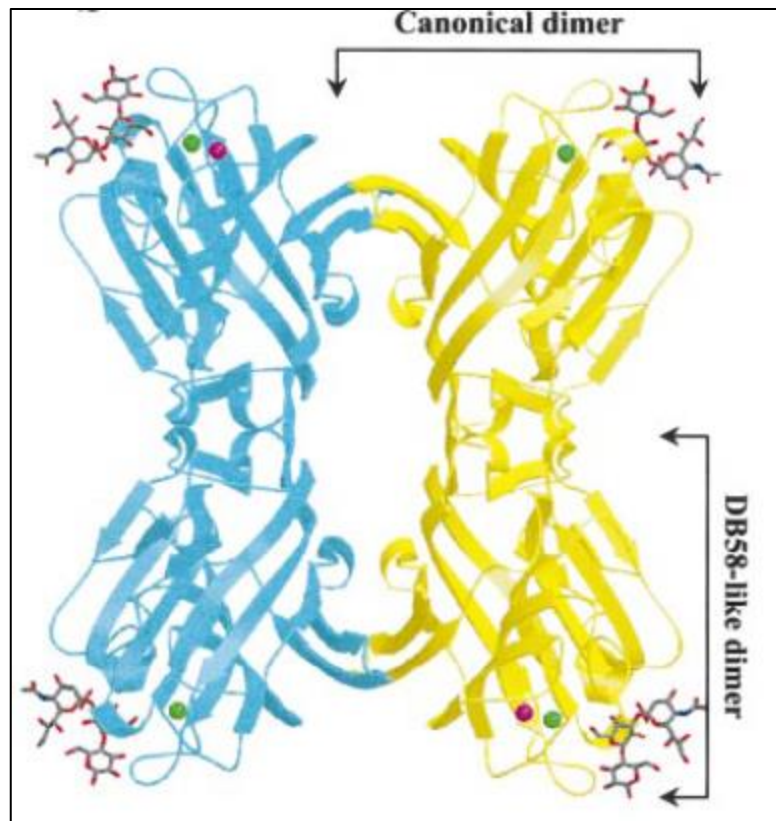


Figura 24. Estrutura tetramérica da MAA. Os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} estão representados como esferas verde e magenta, respectivamente.

Fonte: IMBERTY et al., 2000.

2.5 Isoterma de Langmuir

Os cálculos das constantes de afinidade aparente (K_a) das lectinas por diferentes açúcares podem ser realizados de acordo com o modelo de adsorção de Langmuir. As isotermas são curvas que indicam a forma como o adsorvente efetivamente adsorverá o soluto, se a purificação requerida pode ser obtida, oferece uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente adsorverá e fornece informações que determinam se o adsorvente pode ser economicamente viável para a purificação do líquido (MEZZARI, 2002; MORENO-CASTILLHA, 2004). Existem diversos tipos de isotermas e

estas podem ser agrupadas em seis classes, enquadradas nos tipos de I a V da classificação proposta por Brunauer, Emmett e Teller (GREGG; SING, 1982) e por PIERCE enquadrada o tipo VI (SMÍŠEK; CERNÝ, 1970). Equações teóricas ou semi-empíricas foram desenvolvidas para interpretar ou predizer as isotermas. As equações de Langmuir, Freundlich e BET são as mais utilizadas.

Em 1918, Langmuir propôs uma teoria para explicar a adsorção sobre uma superfície uniforme, simples, infinita e não porosa. O modelo baseia-se na hipótese de movimento das moléculas adsorvidas pela superfície do adsorvente, de modo que à medida que mais moléculas são adsorvidas, há uma distribuição uniforme formando uma monocamada que recobre toda a superfície (AMUDA et al., 2007). A teoria de Langmuir utiliza o conceito dinâmico do equilíbrio de adsorção que estabelece a igualdade nas velocidades de adsorção e dessorção. São utilizadas as seguintes aproximações: a adsorção é monomolecular, a superfície é energeticamente homogênea e não existe interação entre as partículas adsorvidas (RADHIKA; PALANIVELU, 2006).

A expressão da isoterma de Langmuir é representada pela equação abaixo:

$$Q_e = \frac{Q_m \cdot K_L \cdot C_e}{1 + Q_m \cdot C_e}$$

Onde:

K_L é a constante de Langmuir que fornece a capacidade de adsorção teórica na monocamada ($L \cdot g^{-1}$);

Q_m é uma constante relacionada com a energia de adsorção ($L\ mg^{-1}$);

C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio ($mg\ L^{-1}$);

Q_e é a quantidade adsorvida por grama do adsorvente ($mg\ g^{-1}$);

Os parâmetros de adsorção, Q_m e K_L , podem ser determinados transformando a equação de Langmuir para a forma linear. A equação linearizada é expressa a seguir:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m K_L} + \frac{1}{K_L} \cdot C_e$$

Construindo um gráfico temos que, C_e/Q_e em função de C_e é uma reta com interseção $1/Q_m K_L$ e inclinação $1/K_L$.

Para prever se a isoterma de adsorção é favorável ou desfavorável o parâmetro de equilíbrio R_L pode ser calculado através da equação abaixo:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L Q_m}$$

A tabela 1 indica a relação entre o valor de R_L e a possibilidade de adsorção.

Tabela 1. Fator de Separação e tipo de isoterma

Fator de Separação (R_L)	Tipo de Isoterma
$R_L > 1$	Desfavorável
$R_L = 1$	Linear
$0 < R_L < 1$	Favorável
$R_L = 0$	Irreversível

A equação de Langmuir, adaptada à complexação da lectina com o carboidrato, pode-se derivar a partir do equilíbrio entre os carboidratos disponíveis (C^*), lectinas ofertadas (L) e os complexos formados (CL):



A constante K de equilíbrio é fornecida pela equação:

$$K = \frac{CL}{[C^*][L]}$$

Para os parâmetros bioquímicos, a isoterma de Langmuir é formalmente equivalente à equação de Hill, descrita abaixo.

$$\Phi = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} = \frac{[L]^n}{(K_A)^n + [L]^n}$$

Onde:

Φ : fração dos sítios de ligação da proteína que estão ocupados pelo ligante;

$[L]^n$: concentração do ligante livre (não-ligado);

K_d : constant de dissociação aparente, derivada a partir da lei de ação das massas (constante de equilíbrio para dissociação);

K_A : concentração do ligante responsável por ocupar metade dos sítios de ligação da proteína;

n : coeficiente de Hill, o qual descreve cooperatividade (ou possivelmente outra propriedade bioquímica, dependendo do contexto ao qual a equação de Hill seja aplicada).

Em nosso laboratório o glicocódigo de tecidos tem sido investigado mediante quimiluminescência. Para isto lectinas têm sido conjugadas ao EA. A hidrólise do éster, covalentemente ligado à proteína, libera luz (fótons) capaz de ser detectada (luminômetro) e quantificada. Campos et al. (2006) empregaram Con A, conjugada a EA como ferramenta histoquímica quimiluminescente. Biópsias de tecidos mamários normais e com carcinoma ductal invasivo (CDI) foram tratadas com o conjugado Con A-EA. A emissão de fótons observada durante a quebra do EA, ligado à Con A, foi quantificada, expressa em unidade relativa de luz (URL) e correlacionada à marcação do tecido normal e transformado.

Os resultados mostraram uma relação linear entre URL e a área de tecido na faixa de 0.125 - 1.0cm² (Figura 24). Além disso, os valores de URL foram

maiores para o CDI ($1.283.920 \times 10^3 \pm 220.621 \times 10^3$) do que para o tecido normal ($2.565 \times 10^3 \pm 0.247 \times 10^3$), ou seja, cerca de 500 vezes maior.

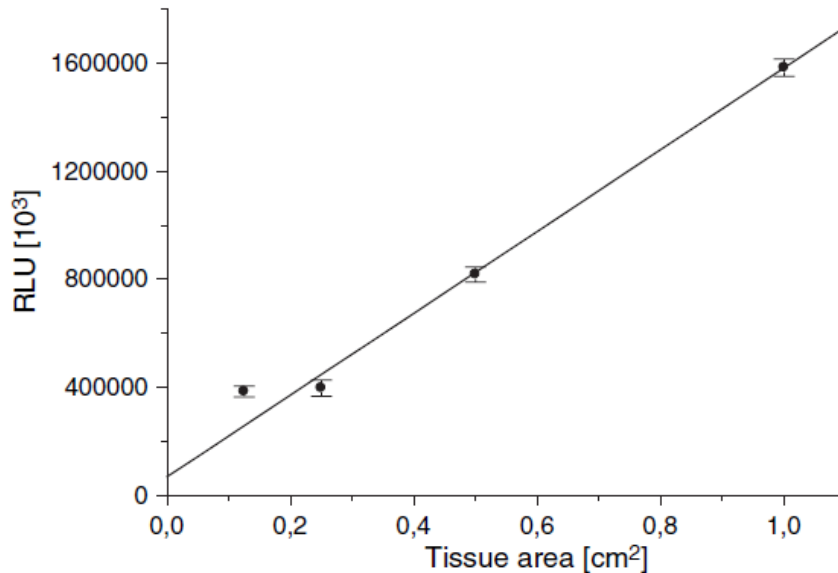


Figura 25. Relação entre quimioluminescência e área de tecido mamário diagnosticado como carcinoma ductal invasivo. A emissão de fótons, expressa em unidades relativa de luz (URL), foi detectada a partir de amostras de tecidos diferentes tratados com concanavalina A conjugada ao éster de acridina (Con A-EA).

Fonte: CAMPOS et al., 2006.

Recentemente, Brustein et al. (2012) repetiram esses resultados com a Con A incluindo amostras de tecidos mamários com fibroadenoma, tumor benigno que surge na unidade lobular do ducto terminal da mama (ABE et al., 2004). Observa-se na Figura 25, que a relação URL *versus* área de tecido diagnosticado com CDI descreve uma curva linear, enquanto que uma hipérbole retangular é obtida para o tecido com fibroadenoma.

Brustein et al. (2012) investigaram ainda os mesmos tecidos, porém, empregando lectina obtida de sementes de amendoim (PNA), específica para galactose (Figura 26). Nesse caso hipérboles retangulares foram descritas para ambos os tecidos.

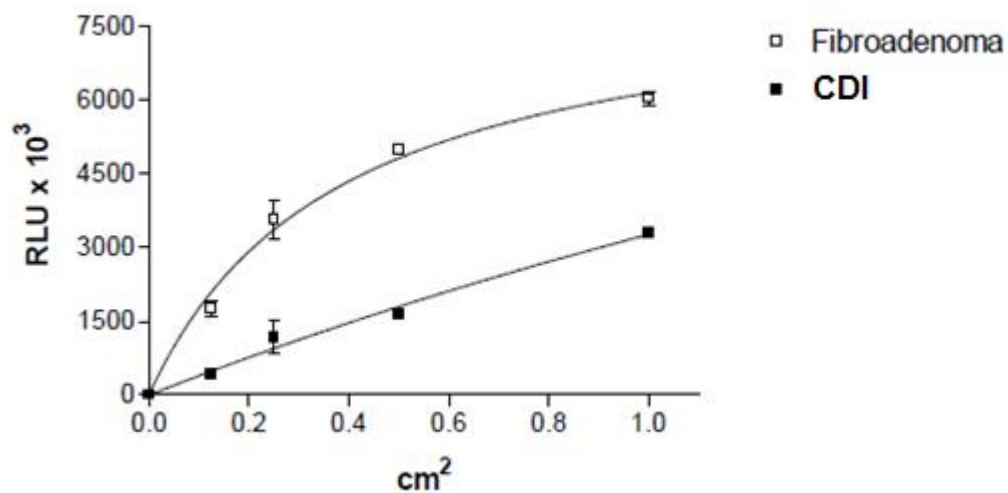


Figura 26. Relação entre URL e a área de tecido mamário diagnosticado como fibroadenoma (□) e CDI (■) empregando ConA-AE.

Fonte: BRUSTEIN et al., 2012

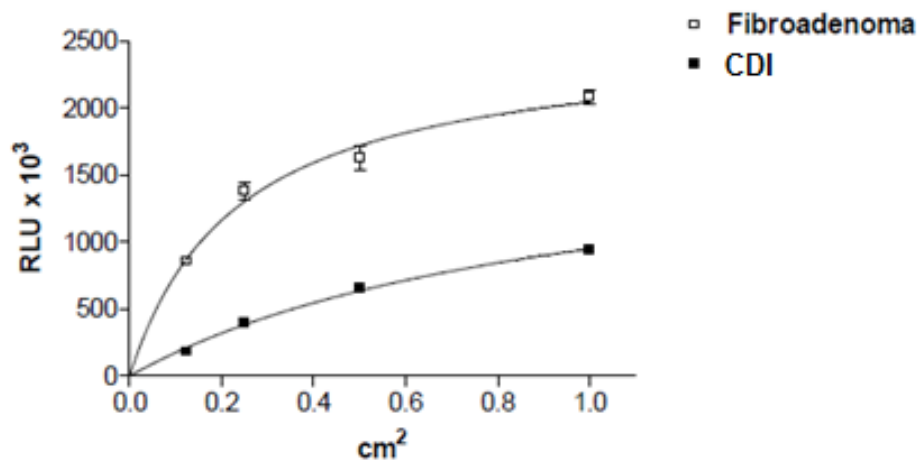


Figura 27. Relação entre URL e a área de tecido mamário diagnosticado como fibroadenoma (□) e CDI (■) empregando PNA-AE.

Fonte: BRUSTEIN et al., 2012.

URL emitidas pelo conjugado Con A-EA revelaram que a emissão de luz é um fenômeno de reconhecimento dependente da área de tecido em estudo, dependendo do número de resíduos de sacarídeo nesta superfície. A razão para o aumento proporcional em URL com a área de tecido, o que foi observado para ambos os tecidos benignos e CDI, está relacionada com a quantidade de complexo lectina-carboidrato formado nos tecidos avaliados. A curva para o fibroadenoma assemelha-se à isoterma de Langmuir, enquanto que para o CDI o aumento da URL foi linear em relação à área de tecido.

Estes resultados indicam que a área de tecido é um parâmetro importante na taxa de reação quimiluminescente nas condições presentes quando lectinas são usadas como sondas histoquímicas. Deve-se enfatizar que Brustein et al (2012) verificaram que a relação proporcional entre a quantidade de hidratos de carbono acessíveis no tecido e seu reconhecimento por lectinas, fenômeno

revelado pela quimiluminescência, foi abolida quando Con A-EA foi inibida pelo seu açúcar específico (metil- α -D-manosídeo).

O desvio da linearidade observada para o fibroadenoma seria um reflexo da expressão glucose/manose e/ou disposição do resíduo carboidrato da glicoproteína da superfície celular nesta doença, desde que a área de tecido estudada foi a mesma do CDI (0.125-1 cm²), bem como a concentração de conjugado e parâmetros de reação semelhantes ao CDI.

2.6 Quimiluminescência

A primeira referência ao fenômeno quimiluminescente remonta a 1877, quando Radziszewski observou que a lofina emitia luz verde ao reagir com o oxigênio na presença de uma base forte. Entretanto, o termo “quimiluminescência” só foi introduzido por Wiedemann, em 1888, que classificou o fenômeno da luminescência em seis tipos diferentes de acordo com a sua forma de excitação (GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000).

A quimiluminescência é definida como emissão de radiação eletromagnética (ultravioleta, visível ou infravermelho) produzida por uma reação química. O fenômeno pode ser observado quando um dos intermediários ou produtos da reação é produzido em estado eletronicamente excitado, que pode emitir radiação ao regressar ao estado fundamental, ou transferir sua energia para outra molécula que, posteriormente, emitirá radiação (LARA; GARCÍA-CAMPAÑA; AARON, 2010).

Substâncias quimiluminescentes podem ser detectadas na faixa de femtomoles ou atomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol), com sensibilidade superior aos

ensaios espectrofotométricos (10^{-6} a 10^{-9} mol) e fluorimétrico (10^{-9} a 10^{-12} mol) (CAMPBELL et al., 1985). Vários compostos orgânicos exibem QL em condições apropriadas, dentre os quais se destacam o luminol, isoluminol, 1,2-dioxetanos, éster de acridina ou seus derivados como alguns dos marcadores utilizados em imunoenaios quimioluminescentes (RODA; GUARDIGLI, 2012).

A exploração da QL para fins analíticos começou na década de 70, para reações em fase gasosa e, na década seguinte, para reações em fase líquida. Desde então, o número de reações que produzem quimiluminescência descritas na literatura tem aumentado com aplicações analíticas na área biomédica, química, ambiental, alimentar e toxicológica (GARCÍA-CAMPAÑA; BAEYENS, 2000).

A aplicação da QL na química analítica depende da acoplagem da substância de interesse a um dos participantes da reação quimiluminescente ou ao produto no estado excitado (Figura 27). A concentração da amostra desconhecida será proporcional à produção de luz total emitida ou a um parâmetro físico associado à luminescência, tal como cor ou polarização da luz emitida (RODA et al., 2000).

A detecção quimiluminescente apresenta inúmeras vantagens, tais como, possibilidade de quantificação, baixos limites de detecção (na faixa de femtomoles); simplificação do sistema óptico, uma vez que não necessita de uma fonte de radiação externa; ensaios rápidos; substituição aos radioisótopos, os quais se tornaram poucos populares devido à sua curta meia vida, ao perigo potencial à saúde e aos problemas quanto aos dejetos gerados (GAMIZ-GRACIA et al., 2009).

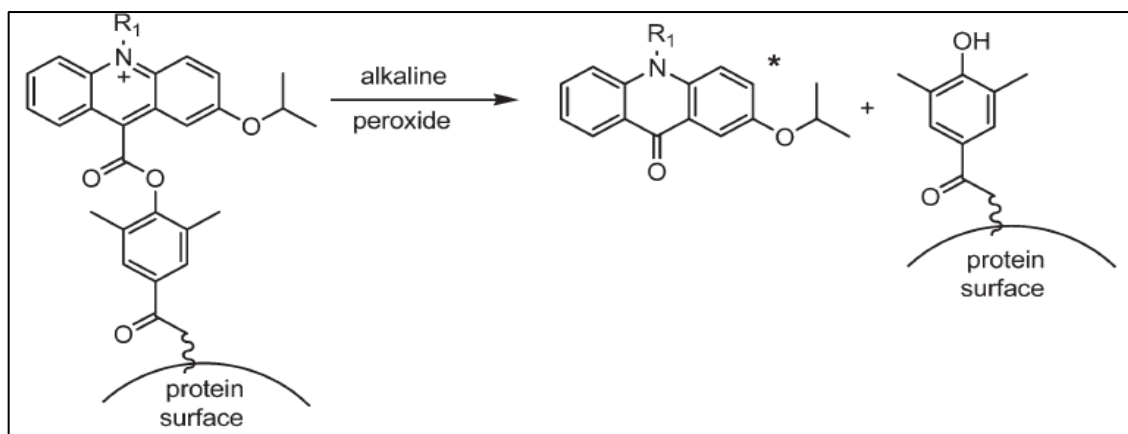


Figura 28. Conjugação do EA à proteína e reação quimiluminescente do anel acridona conjugado à biomolécula.

Fonte: NATRAJAN; WEN, 2015.

A QL pode ser utilizada, como método de detecção, em técnicas separativas como cromatografia líquida de alta performance (GAMIZ-GRACIA et al., 2009), eletroforese capilar (LARA; GARCÍA-CAMPAÑA; AARON, 2010), imunoensaios (FAN et al., 2009), biossensores (LUO et al., 2012) e imageamento *in vitro* (RODA et al., 2011) e *in vivo* (RODA et al., 2009; WU et al., 2009), agregando a elevada especificidade destas técnicas com os baixos limites de detecção proporcionados pelos ensaios quimiluminescentes.

Vários sais de acridina podem ser estimulados a produzir luz em presença de solução alcalina de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na ausência de catalisador. Tais compostos incluem os derivados de acridina, moléculas que possuem um nitrogênio quaternário central e uma ramificação no carbono 9 onde está inserido um radical éster fenil instável (NATRAJAN; SHARPE; WEN, 2012). A figura 28 ilustra o mecanismo proposto para reação quimiluminescente do EA. Em condições alcalinas, o ânion peróxido de

hidrogênio (HOO^-) ataca a molécula de acridina, e a mesma sofre um rearranjo intermolecular formando o intermediário dioxetano (IV). Este composto se decompõe rapidamente produzindo radical fenol ligado à proteína e N-metilacridona (V), cujo fóton liberado pode ser detectado a 470 nm (KING et al., 2007).

Ésteres de acridina substituíram rapidamente os compostos quimiluminescentes luminol e isoluminol por apresentarem ensaios mais rápidos e maior sensibilidade (KRICKA, 2003). Portanto, essas moléculas têm sido amplamente utilizadas na detecção de DNA, RNA e enzimas, em imunoenaios (RODA; GUARDIGLI, 2012), em análise de água e alimentos (KING et al., 2007; LIU; LIN; LIN, 2010), em imunohistoquímica (RÊGO et al., 2013b; ARAÚJO-FILHO et al., 2013) e na histoquímica com lectinas (CAMPOS, et al., 2006; BRUSTEIN et al., 2012; LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2014)

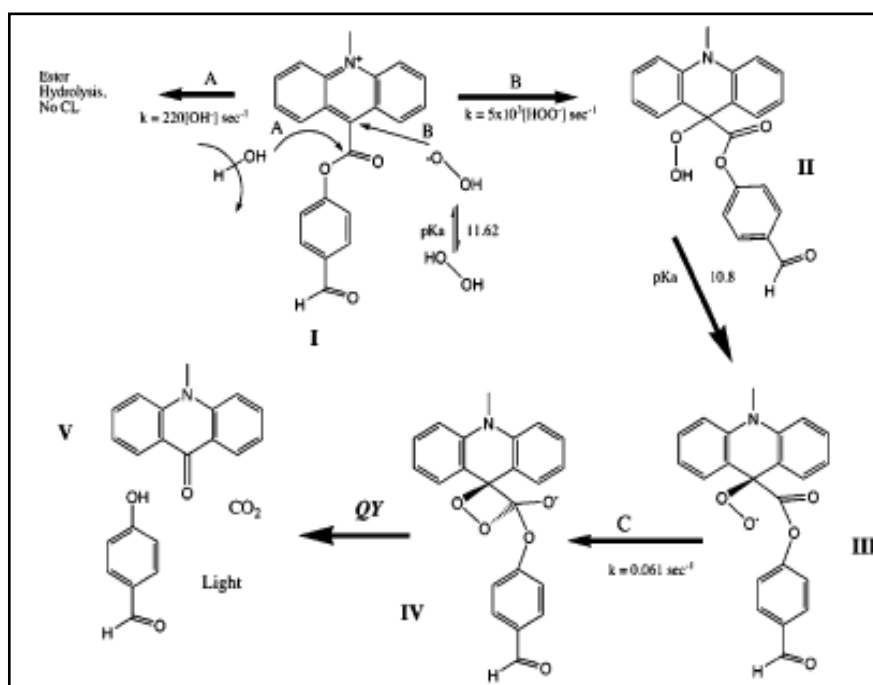


Figura 29. Reação quimiluminescente do EA.

Fonte: KING et al., 2007.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H. et al. Invasive ductal carcinoma within a fibroadenoma of the breast.

Int. J. Clin. Oncol., v. 9, p. 334-338, 2004.

ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1820, p. 1347-1353, 2012.

ALAM, M.; RATNER, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **N Engl J Med**, v. 344, p. 975-983, 2001.

AMUDA, O. S.; GIWA, A. A.; BELLO, I. A. Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified activated coconut shell carbon. **Biochem Eng J.**, v. 36, p. 174-181, 2007.

ANDRADE, C. G. et al. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **Int. J. Nanomedicine.**, v. 8, p. 4623-4629, 2013.

ARAÚJO-FILHO, J. L. S. et al. Potential applications of the chemiluminescent methods in tumoral diseases investigation. **Int. J. Pharma. Bio Sci.**, v. 2, p. 392-400, 2011.

ARAÚJO-FILHO, J.L. et al. Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 6, p. 1861-1867, 2013.

ARDÁ, A. et al. Chiral diaminopyrrolic receptors for selective recognition of mannosides, part 2: a 3D view of the recognition modes by X-ray, NMR spectroscopy and molecular modeling. **Chemistry.**, v. 17, p. 4821-4829, 2011.

- AUDFRAY, A. et al. A Recombinant Fungal Lectin for Labeling Truncated Glycans on Human Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10, p. 1-22, 2015.
- BADR, H. A. et al. Preferential lectin binding of cancer cells upon sialic acid treatment under nutrient deprivation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 171, p. 963-974, 2013.
- BANERJEE, R. et al. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **J. Mol. Biol.**, v. 259, p. 281-296, 1996.
- BERTOZZI, C. R.; RABUKA, D. Structural Basis of Glycan Diversity. In: **Essentials of Glycobiology**. 2^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Cap. 2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1955/>. Acesso em: 7 agosto 2015.
- BHANDARI, P. R.; PAI, V. V. Novel Medical Strategies Combating Nonmelanoma Skin Cancer. **Indian. J. Dermatol.**, v. 59, p. 531-546, 2014.
- BLOMME, B. et al. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **J. Hepatol.**, v. 50, p. 592-603, 2009.
- BOUCKAERT, J. et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesin. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 441-455, 2005.
- BOUWES-BAVINCK, J. N. et al. Multicenter study of the association between betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. **Cancer Res.**, v. 70, p. 9777–9786, 2010.

- BOYD, W. C.; WASZCZENKO-ZACHARCZENKO, E.; GOLDWASSER, S. M.
List of plants tested for hemagglutinating activity. **Transfusion.**, v. 1, p.374-382, 1961.
- BRENN, T.; MCKEE, P. H. Tumors of the surface epithelium. In: **Pathology of the skin with clinical correlations**, 3rd ed. China: Elsevier Philadelphia; 2005. p. 1153-240.
- BROOKS, S. A. Strategies for Analysis of the Glycosylation of Proteins: Current Status and Future Perspectives. **Mol. Biotechnol**, v. 43, p. 76-88, 2009.
- BRUSTEIN, V. P. et al. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, p. 268-275, 2012.
- CAMPBELL, A. K.; HALLET, M. B.; WEEKS I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. **Methods Biochem. Anal.**, v. 31, p. 317-416, 1985.
- CAMPOS, L. M. et al. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers.**, v. 5, p. 480-484, 2006.
- CARR, R. A.; TAIBJEE, S. M.; SANDERS, D. S. A. Basaloid skin tumours: Basal cell carcinoma. **Curr. Diagn. Pathol.**, v. 13, p. 252–272, 2007.
- CARVALHO, K. C. et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. **Clinics**, v. 66, p. 965-972, 2011.
- CAZAL, P.; LALAUURIE, M. Recherches sur quelques phyto-agglutinines spécifiques des groupes sanguins ABO. **Acta Haematol.**, v. 8, p. 73-82, 1952.

- CHINEM, V. P.; MIOT, H. A. Epidemiologia do carcinoma basocelular. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, p. 292-305, 2011.
- CHUANG, Y.J. et al. A convenient method for synthesis of glyconanoparticles for colorimetric measuring carbohydrate-protein interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 389, p. 22-27, 2009.
- CLARK, M.A. et al. Selective binding and transcytosis of *Ulex europaeus* I lectin by mouse Peyer's patch M-cells in vivo. **Cell Tissue Res**, v. 282, p. 455-461, 1995.
- COCKEREL, C. J. Histopathology of incipient intrapidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 42, p. 11-17, 2000.
- CUMMINGS, R. D.; ETZLER, M. R-type Lectins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Cap. 28. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1940/>. Acesso em: 7 agosto 2015.
- CUMMINGS, R. D.; McEVER R. P. C-type Lectins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Cap. 31. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1943/>. Acesso em: 7 agosto 2015.
- DAL BÓ, A. G. et al. Synthesis, micellization and lectin binding of new glycosurfactants. **Carbohydr. Res.**, v. 397, p. 31-36, 2014.
- DAM, T. K.; BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. **Chemical Reviews**. v. 102, p. 387-429, 2002.

- DATTA, S. et al. Glycolysis inhibitor screening identifies the bis-geranylacylphloroglucinol protonophore moronone from *Moronobea coccinea*. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 2216-2222, 2012.
- DAVIES, T. W. et al. Diet and basal cell skin cancer: Results from the EPIC-Norfolk cohort. **Br. J. Dermatol.**, v. 146, p. 1017-1022, 2002.
- DEMARCO, M. L.; WOODS, R. J. Atomic-resolution conformational analysis of the GM3 ganglioside in a lipid bilayer and its implications for ganglioside-protein recognition at membrane surfaces. **Glycobiology**, v. 19, p. 344-355, 2009.
- DOOLEY, T. P. et al. Biomarkers of human cutaneous squamous cell carcinoma from tissues and cell lines identified by DNA microarrays and qRT-PCR. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 306, p. 1026-1036, 2003.
- DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 9, p. 237-264, 1993.
- DRICKAMER, K. In: **Molecular Glycobiology**; Fukuda, M., Hindsgaul, O., Eds.; Oxford University Press: Oxford, 1994; p 53.
- DWEK, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 683-720, 1996.
- EBERT, C. et al. Inhibitory effect of the lectin wheat germ agglutinin (WGA) on the proliferation of AR42J cells. **Acta Histochem.**, v. 111, p. 335-342, 2009.
- ETZLER, M. E.; SUROLIA, A.; CUMMINGS, R. D. L-type Lectins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Cap. 29. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1935/>. Acesso em: 7 agosto 2015.

- EUVRARD, S.; KANITAKIS, J.; CLAUDY, A. Skin cancers after organ transplantation. **N. Eng. J. Med.**, v. 348, p.1681-1691, 2003.
- FAN, A. et al. Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses. **Anal. Sci.**, v. 25, p. 587–597, 2009.
- FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature**, v. 5, p. 526-542, 2005.
- GÁMIZ-GRACIA, L. et al. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis - A review. **Anal. Chim. Acta.**, v. 640, p. 7-28, 2009.
- GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 444-452, 1996.
- GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; BAEYENS, W.R.G. Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. **Analysis**, v. 28, p. 686-698, 2000.
- GARCIA-ZUAZAGA, J.; OLBRICHT, S. M. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. **Adv. Dermatol.**, v. 24, p. 33-57, 2008.
- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem.**, v. 113, p. 236-254, 2011.
- GIRNITA, L. et al. Inhibition of N-linked glycosylation downregulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills Ewing's sarcoma cells: therapeutic implications. **Anticancer Drug Des.**, v. 15, p. 67-72, 2000.

- GRANGER, R. H. et al. Association between dietary fat and skin cancer in an Australian population using casecontrol and cohort study designs. **BMC Cancer**, v. 6, p. 1-7, 2006.
- GREEN, A.; BATTISTUTTA, D. Incidence and determinants of skin cancer in a high-risk Australian population. **Int. J. Cancer.**, v. 46, p. 356-361, 1990.
- GURUDUTT, V. V.; GENDEN, E. M. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **J. Skin Cancer**, v. 2011, p. 1-10, 2010.
- HASSID, S. et al. Histochemical study of the epithelia of nasal polyps by biotinylated lectins and neoglycoprotein a comparison with the normal human respiratory epithelium. **Eur. J. Morphol.**, v.35, p. 79-86, 1997.
- HASSID, S. et al. Glycohistochemical characteristics of nasal polyps from patients with and without cystic fibrosis. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.126, p. 769-776, 2000.
- HOLMES, M.J. et al. Lectin receptors in the human cornea. **Cornea**, v. 86, p. 30-34, 1985.
- IMBERTY, A. et al. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 17541-17548, 2000.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

- JEYAPRAKASH, A. A. et al. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an x-ray and modeling study. **J. Mol. Biol.**, v. 332, p. 217–228, 2003.
- JUNG, D. W. et al. A unique small molecule inhibitor of enolase clarifies its role in fundamental biological processes. **ACS Chem. Biol.**, v.8, p. 1271–1282, 2013.
- KESSIMIAN, N. et al. Lectin binding to parietal cells of human gastric mucosa. **J Histochem Cytochem**, v. 34, p. 237-243, 1986.
- KHAN, F. et al. Lectins as markers for blood grouping. **Med. Sci. Monit.**, v. 8, p. 293-300, 2002.
- KIM, Y. J.; VARKI, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. **Glycoconj. J.**, v. 14, p. 569-576, 1997.
- KING, D.W. et al. Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development and Optimization Using a Kinetic Model. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 4169-4176, 2007.
- KIRKHAM, N. Tumors and cysts of the epidermis. In: Elder DE, editor. **Lever's histopathology of the skin**, 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2009. p. 791-849.
- KO, C. Keratoacanthoma: Facts and controversies. **Clin. Dermatol.**, v. 28, p. 254-261, 2010.
- KOPKE, L. F. F.; SCHMIDT, S. M. Carcinoma basocelular. **An. Bras. Dermatol.**, v. 77, p. 249-282, 2002.

- KORNFELD, S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 307-330, 1992.
- KRICKA, L.J. Clinical applications of chemiluminescence. **Anal. Chim. Acta.**, v. 500, p. 279-286, 2003.
- La BELLE, J. T. et al. Label-free impedimetric detection of glycan-lectin interactions. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 6959-6964, 2007.
- LALLI, R. C. et al. *Maackia amurensis* agglutinin enhances paclitaxel induced cytotoxicity in cultured non-small cell lung cancer cells. **Biochimie**. 2015 DOI: 10.1016/j.biochi.2015.05.002
- LARA, F. J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; AARON, J. J. Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems - A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 679, p. 17-30, 2010.
- LAZAR, I. M. et al. Recent advances in the MS analysis of glycoproteins: Theoretical considerations. **Electrophoresis**, v. 32, p. 3 – 13, 2011.
- LEAR, W.; DAHLKE, E.; MURRAY, C. A. Basal cell carcinoma: review of epidemiology, pathogenesis, and associated risk factors. **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 11, p. 19-30, 2007.
- LI, S. et al. The mTOR inhibitor AZD8055 inhibits proliferation and glycolysis in cervical cancer cells. **Oncol. Lett.**, v. 5, p. 717-721, 2013.
- LIANG, P. H.; WANG, S. K.; WONG, C. H. Quantitative analysis of carbohydrate-protein interactions using glycan microarrays: determination of surface and solution dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.**, v.129, p. 11177-11184, 2007.

- LIMA, L. R. A. et al. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. **Dis. Markers**, v. 35, p.149-154, 2013.
- LINMAN, M. J. et al. Surface plasmon resonance study of protein-carbohydrate interactions using biotinylated sialosides. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 4007-4013, 2008.
- LOMAS, A.; LEONARDI-BEE, J.; BATH-HEXTALL, F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. **Br. J. Dermatol.**, v. 166, p. 1069-1080, 2012.
- LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1383, p. 9-36, 1998.
- LORIS, R. et al. Structural basis of carbohydrate recognition by lectin II from *Ulex europaeus*, a protein with a promiscuous carbohydrate-binding site. **J. Mol. Biol.**, v. 301, p. 987-1002, 2000.
- LUDWIG, T.; Le BORGNE, R.; HOFLACK, B. Roles for mannose-6-phosphate receptors in lysosomal enzyme sorting, IGF-II binding and clathrin-coat assembly. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 202-206, 1995.
- MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. M. Non-melanoma skin cancer. **Lancet.**, v. 375, 673–685, 2010.
- MALONEY, M. E. Arsenic in dermatology. **Dermatol. Surg**, v. 22, p. 301-304, 1996.
- MALZ, C.R. ; SCHWARTZ, P.; KUHN, H.J. Lectin binding sites in the vomeronasal organ and the olfactory epithelium of the tree shrew *tupaia belangeri*. **J. Hirnforsch.**, v. 39, p.481-487, 1999.

- MEHTA, S. et al. Potential importance of *Maackia amurensis* agglutinin in non-small cell lung cancer. **Biol. Chem.**, v. 394, p. 889-900, 2013.
- MEILIN, L.; ZHEN, L.; JIN-MING, L. A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis. **Anal. Chim. Acta.**, v. 670, p. 1-10, 2010.
- MEISSNER, C. et al. L-fucose residues o cellulose-based dialysis membranes: quantification of membraneassociated l-fucose and analysis of specific lectin binding. **Glycoconj J**, v. 12, p. 632-638, 1995.
- MEZZARI, I. A. Utilização de carvões adsorventes para o tratamento de efluentes contendo pesticidas [dissertação de mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2002.
- MIETTINEN, M. et al. *Ulex europaeus* I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells. **Am J Clin Pathol**, v. 79, p. 32-36, 1983.
- MING, L. et al. Chemiluminescence biosensors for DNA detection using graphene oxideand a horseradish peroxidase-mimicking DNA enzyme. **Chem. Commun.**, v. 48, p. 1126–1128, 2012.
- MODY, W.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.**, v. 33, p. 1-10, 1995.
- MOLHO-PESSACH, V.; LOTEM, M. Ultraviolet radiation and cutaneous carcinogenesis. **Curr. Probl. Dermatol.**, v. 35, p.14-27, 2007.
- MORENO-CASTILLA, C. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. **Carbon.**, v. 42, p. 83-94, 2004.

- MULEY, P.; OLINGER, A.; TUMMALA, H. 2-Deoxyglucose induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells independent of its glycolysis inhibition. **Nutr. Cancer**, v. 67, p. 514–522, 2015.
- MURTHY, B.N. et al. SPR and ITC determination of the kinetics and the thermodynamics of bivalent versus monovalent sugar ligand-lectin interactions. **Glycoconj. J.**, v. 25, p. 313-321, 2008.
- NATCHIAR, S. K. et al. Structural studies on peanut lectin complexed with disaccharides involving different linkages: further insights into the structure and interactions of the lectin. **Acta Cryst.**, v. D62, p. 1413-142, 2006.
- NATRAJAN, A.; SHARPE, D.; WEN, D. Chemiluminescence from alkoxy-substituted acridinium dimethylphenyl ester labels. **Org. Biomol. Chem.**, v. 10, p. 3432-3447, 2012.
- NATRAJAN, A.; WEN, D. A comparison of chemiluminescent acridinium dimethylphenyl ester labels with different conjugation sites. **Org. Biomol. Chem.**, 2015 DOI: 10.1039/c4ob02528h.
- NILSSON, C. L. Lectins: Analytical Tools from Nature. In: **Lectins: Analytical Technologies**. Nilsson, C. L editor. Florida: Elsevier B.V. 2007. 456 p.
- NING, Z. Y. et al. Detection of expression of influenza virus receptors in tissues of BALB/c mice by histochemistry. **Vet. Res. Commun.**, v. 33, p. 895-903, 2009.
- NOURI, K. et al. Rare presentation of basal cell carcinoma. **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 6, p. 226-228, 2002.
- OGDEN, S.; TELFER, N. Skin cancer. **Medicine**, v. 37, p. 305-308, 2009.

- OKUMURA, H. et al. Diverse lectin-binding specificity of four ZP3 glycoprotein isoforms with a discrete isoelectric point in chicken egg coat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 424, p. 586-592, 2012.
- PEI, Z. Carbohydrate synthesis and study of carbohydrate-lectin interactions using QCM biosensors and microarray technologies [tese de doutorado]. Stockholm: KTH Chemical Science and Engineering; 2006.
- PELICANO, H. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**, v. 25, p. 4633-4646, 2006.
- PETTER, G.; HAUSTEIN, U. Histologic subtyping and malignancy assessment of cutaneous squamous cell carcinoma. **Dermatol. Surg.**, v. 26, p. 521-530, 2000.
- PEWMANS, L. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 347-352, 1995.
- PIMPARKAR, B. D.; BHAVE, A. Arsenicosis: Review of recent advances. **J. Assoc. Physicians India**, v. 58, p. 617-624, 2010.
- POWLESLAND, A. S. et al. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. **Glycobiology**, v. 19, p. 899-909, 2009.
- RABINOVICH, G. A. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 17, p. 513-520, 2007.
- RADHIKA, M.; PALANIVELU, K., Adsorptive removal of chlorophenols from aqueous solution by low cost adsorbent-Kinetics and isotherm analysis. **J. Hazard Mater.**, v. 138, p. 116-124, 2006.

- RAVISHANKAR, R. et al. Crystal structures of the peanut lectin–lactose complex at acidic pH: Retention of unusual quaternary structure, empty and carbohydrate bound combining sites, molecular mimicry and crystal packing directed by interactions at the combining site. **Proteins: Structure, Function, and Genetics.**, v. 43, p. 260-270, 2001.
- RÊGO, M. J. et al. Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. **Med. Mol. Morphol.**, v. 46, p. 92-96, 2013a.
- RÊGO, M.J.B.M. et al. Imunohistoquimiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. **Dis. Markers**, v. 34, p. 373-377, 2013b.
- RENDU, F.; LEBRET, M. Interaction of wheat germ agglutinin with human platelets: a model for studying platelet response. **Thromb. Res.**, v. 36, p. 447-456, 1984.
- RICARD-BLUM, S. et al. Dual polarization interferometry characterization of carbohydrate-protein interactions. **Anal. Biochem.**, v. 352, p. 252-259, 2006.
- RICOTTI, C. et al. Malignant Skin Neoplasms. **Med. Clin. North Am.**, v. 93, p. 1241-1264, 2009.
- RODA, A. et al. . Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 366, p. 752-759, 2000.
- RODA, A. et al. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. **Trends Anal. Chem.**, v. 28, p. 307–322, 2009.

- RODA, A. et al. Portable device based on chemiluminescence lensless imaging for personalized diagnostics through multiplex bioanalysis. **Anal. Chem.**, v. 83, p.3178–3185, 2011.
- RODA, A; GUARDIGLI, M. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 69-76, 2012.
- ROEWERT-HUBER, J. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. **Br. J. Dermatol.**, v. 157, p. 47-51, 2007.
- RUBIN, A. I.; CHEN, E. H.; RATNER, D. Basal-cell carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 2262-2269, 2005.
- SAFINA, G. et al. Surface plasmon resonance for real-time study of lectin–carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins. **Talanta**, v. 84, p. 1284-1290, 2011.
- SAHL, W. J. et al. Basal cell carcinoma and lifestyle characteristics. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, p. 398-402.
- SAMARASINGHE, V.; MADAN, V.; LEAR, J. T. Management of high-risk squamous cell carcinoma of the skin. **Expert. Rev. Anticancer Ther.**, v. 11, p. 763–769, 2011a.
- SAMARASINGHE, V.; MADAN, V.; LEAR, J. T. Focus on basal cell carcinoma. **J. Skin. Cancer**, 2011b. doi: 10.1155/2011/328615.
- SANDERS, D. A. et al. The 1.2 Å resolution structure of the Con A-dimannose complex. **J. Mol. Biol.**, v. 310, p. 875-884, 2001.

- SCHWARTZ, R. A. Keratoacanthoma. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 30, p. 1-19, 1994.
- SCHWEFEL, D. et al. Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, p. 8704-8719, 2010.
- SHARMA, R., SCHUMACHER, U; ADAM, E. Lectin histochemistry reveals the appearance of M-cells in Peyer's patches of SCID mice after syngeneic normal bone marrow transplantation. **J Histochem Cytochem**, v. 46, p. 143-148, 1998.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science.**, v. 246, p. 227-234, 1989.
- SHEN, Z. et al. No labeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 2312-2319, 2007.
- SILVA, L. P. et al. Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, p. 3800-3807, 2014.
- SKELTON, L. A. The effective treatment of basal cell carcinoma. **Br. J. Nurs.**, v. 18, p. 348-350, 2009.
- SMETANA Jr, K. et al. Functional consequences of the glycophenotype of squamous epithelia - practical employment. **Folia Biol. (Praha)**, v. 49, p. 118-127, 2003.
- SMÍSEK, M.; CERNY, S. Active carbon: manufacture, properties and applications. New York: Elsevier, 1970.

- SMITS, T.; MOOR, A. C. E. New aspects in photodynamic therapy of actinic keratosis. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 96, 159-169, 2009.
- SOBRAL, A. P. V. et al. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of Oral Science**, v. 52, p. 49-54, 2010.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/medicos/atualidade/Noticia.aspx>> Acesso em 07 jul. 2015.
- TAN, K. B.; LEE, Y. S. Immunoexpression of Bcl-x in squamous cell carcinoma and keratoacanthoma: differences in pattern and correlation with pathobiology. **Histopathology**, v. 55, p. 338-345, 2009.
- TUORI, A.; VIRTANEN, I; UUSITALO, H. Lectin binding in the anterior segment of the bovine eye. **Histochem J**, v. 26, p. 787-798, 1994.
- VARKI, A.; ETZLER, M. E.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Cap. 26. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1923/>. Acesso em: 7 agosto 2015.
- VARKI, A.; KORNFELD, S. P-type Lectins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Cap. 30. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1951/>. Acesso em: 7 agosto 2015.
- VARKI, A.; CROCKER, P. R. I-type Lectins. In: **Essentials of Glycobiology**. 2^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Cap. 32.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1959/>. Acesso em: 7 agosto 2015.

VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A. et al. Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developing of drugs against cancer. **Front. Oncol.**, v. 5, p. 1-23, 2015.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, p. 309-314, 1956.

WEEDON, D. Keratoacanthoma: a personal perspective. **Curr. Diagn. Pathol.**, v. 9, p 259-265, 2003.

WEIS, W. I.; DRICKAMAR, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 441-473, 1996.

WETZIG, T. et al. Treatment of basal cell carcinoma. **J. Dtsch. Dermatol. Ges.**, v. 7, p. 1075-1082, 2009.

WIMMEROVÁ, M. et al. Stacking interactions between carbohydrate and protein quantified by combination of theoretical and experimental methods. **PLoS One.**, v. 7, p. 1-9, 2012.

WU, C. et al. In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from Cypridina bioluminescence to an organic dye. **PNAS**, v. 106, p. 15599-15603, 2009.

WU, J. H. et al. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the Ricinus communis toxic protein (ricin). **Biochimie.**, v. 88, p. 201-217, 2006.

YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; IRIMURA, T. Sialic acid-binding motif of Maackia amurensis lectins. **J. Biochem.**, v. 121, p. 756-761, 1997.

4.1 Geral

Avaliar, por quimiluminescência, a complexação de lectinas aos carboidratos específicos e o glicofenótipo de lesões tumorais cutâneas empregando lectinas conjugadas a éster de acridina.

4. OBJETIVOS

4.2 Específicos

- Conjugar lectinas comerciais (Con A, UEA-I, PNA, WGA e MAA) ao EA;
- Purificar o conjugado lectina-EA através de cromatografia de peneira de exclusão utilizando Sephadex G-25;
- Marcar tecidos cutâneos humanos e epiderme normal;
- Quantificar a marcação através dos fótons emitidos durante a hidrólise do EA e estabelecer correlação com o perfil de carboidratos dos tumores avaliados;
- Sintetizar discos de polissacarídeos de N-acetilglicosamina, glicose e galactose (quitosana, phytagel e carragenina, respectivamente);
- Verificar a formação de complexo das lectinas com os carboidratos que constituem o polissacarídeo;
- Estabelecer se a formação desses complexos obedece ao modelo matemático de Langmuir.

5. RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1 - Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester

5.2 CAPÍTULO 2 - Lectin-carbohydrate complex evaluation by chemiluminescence

CAPÍTULO 1

Artigo publicado no periódico Disease Markers

Fator de Impacto: 1,562

Qualis Capes: B2

Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester

Luiza Rayanna Amorim Lima¹, Matheus Filgueira Bezerra¹, Sinara Mônica Vitalino Almeida^{1,2}, Lúcia Patrícia Bezerra Gomes Silva¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,3}, and Luiz Bezerra Carvalho Júnior^{1,3}

¹*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil.*

²*Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), 50100 Garanhuns, PE, Brazil.*

³*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil.*

Research Article

Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester

Luiza Rayanna Amorim Lima,¹ Matheus Filgueira Bezerra,¹
Sinara Mônica Vitalino Almeida,^{1,2} Lúcia Patrícia Bezerra Gomes Silva,¹
Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão,^{1,3} and Luiz Bezerra Carvalho Júnior^{1,3}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil

² Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), 50100 Garanhuns, PE, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to Luiz Bezerra Carvalho Júnior; lbcj@hotmail.com.br

Received 27 March 2013; Revised 13 June 2013; Accepted 21 June 2013

Academic Editor: Timothy M. Block

Copyright © 2013 Luiza Rayanna Amorim Lima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Tumor cells show alterations in their glycosylation patterns when compared to normal cells. Lectins can be used to evaluate these glycode changes. Chemiluminescence assay is an effective technique for quantitative analysis of proteins, nucleic acids, and carbohydrates due to its high sensitivity, specificity, and rapid testing. **Objective.** To use histochemiluminescence based on lectin conjugated to acridinium ester (AE) for the investigation of glycophenotype changes in cutaneous tumors. **Methods.** Concanavalin A (Con A), Peanut agglutinin (PNA), *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I), and *Maackia amurensis* agglutinin (MAA) were conjugated to acridinium ester. Biopsies of cutaneous tumors and normal skin were incubated with the lectins-AE, and chemiluminescence was quantified and expressed as Relative Light Units (RLU). **Results.** Actinic keratosis (AK), keratoacanthoma (KA), squamous cell carcinoma (SCC), and basal cell carcinoma (BCC) showed lower expression of α -D-glucose/mannose and α -L-fucose residues compared to normal tissue. Cutaneous tumors displayed higher expression of Gal- β (1-3)-GalNAc residues than normal tissue. AK and SCC exhibited higher expression of Neu5Ac- α (2,3)Gal residues than normal epidermis. KA and BCC showed equivalent RLU values compared to normal tissue. **Conclusions.** Lectin histochemiluminescence allowed quantitative assessment of the carbohydrate expression in cutaneous tissues, contributing to eliminate the subjectivity of conventional techniques used in the histopathological diagnosis.

1. Introduction

Nearly all types of malignant cells and many types of diseased tissue cells demonstrate alterations in their glycosylation patterns when compared to their normal counterparts [1]. Alterations in glycosyltransferases expression, sugar nucleotide donors, and disruption of the Golgi contribute to the development of diseases, such as hereditary disorders, immune deficiencies, cardiovascular disease, and cancer [2, 3]. In the tumor environment, underexpression, truncation or altered branching patterns of certain glycans, and/or changes in glycosylation allow neoplasm cells to usurp many

of the events that occur in development such as receptor activation, cell adhesion, and cell motility, which permits tumor cells to invade and spread throughout the organism [4]. The investigation of lectin-carbohydrates interactions is necessary for the understanding of both the glycophenotype and the behavior of the tumor during its differentiation and confirms the hypothesis that biochemical changes in the cell are events that may signal the cell differentiation [5].

Lectins have been used to evaluate the glycophenotype in skin tissues [6–9]. Lectin histochemistry based on colorimetric detection has been used as a supporting tool for differential diagnosis for skin lesions, but this technique only

permits qualitative or semiquantitative analyses of carbohydrates expression. Thus, quantitative analyses require a sensitive detection that permits an objective and quantitative evaluation of the bound lectin.

Chemiluminescence (CL) analyses represent a powerful tool in life sciences, offering high detectability and specificity [10, 11] and allowing low limits of detection (attomole-zeptomole) and versatility [12]. It is a promising and effective technique for quantitative analysis of proteins, nucleic acids, and carbohydrates [13–15]. Therefore, this approach combined with lectin histochemistry could be valuable to reduce the subjective evaluation.

Acridinium ester (AE) compounds quickly outperformed luminol and isoluminol in chemiluminescence for their low detection limits (attomolar range) and specificity [16]. Exposure of AE label to an alkaline hydrogen peroxide solution triggers a flash of light. AE forms an unstable dioxetane yielding *N*-methylacridone and produces light at a wavelength of 470 nm [17].

The skin tumors comprise mainly basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinoma (SCC), keratoacanthoma (KA), and actinic keratosis (AK). Nonmelanoma skin cancers are the most common form of cancer and their incidence has been increasing considerably. These tumors are rarely fatal but are considered to be fast growing and if neglected may be locally and functionally destructive [18]. The diagnosis of skin neoplasias becomes inaccurate, in some cases, due to a variety of factors that affect the test accuracy, such as a huge spectrum of tumors and their variants and the lower differentiation [8].

Here lectins conjugated to AE were used to evaluate the glycophenotype in tissues from cutaneous tumors based on the chemiluminescence approach. The biological relevant carbohydrate residues α -D-glucose/mannose, Gal- β (1-3)-GalNAc, α -L-fucose, and Neu5Ac- α (2,3) were evaluated, respectively, by using the lectins Concanavalin A (Con A), Peanut agglutinin (PNA), *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I), and *Maackia amurensis* agglutinin (MAA).

2. Material and Methods

2.1. Reagents. *N*-hydroxysuccinimide-activated dimethyl acridinium ester ((DMAE-NHS)/1966-1-53-2/Organic Lab) was kindly supplied by Dr. H. H. Weetall. Con A, PNA, UEA-I, MAA, *N,N*-dimethylformamide, trypsin from porcine pancreas, methyl- α -D-mannoside, D-galactose, α -L-fucose, *n*-acetylneuraminic acid, and Sephadex G-25 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chemiluminescent detection was performed using Siemens Reagent TSH 500T (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, USA) composed of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 and 0.25 M NaOH. Xylene and ethanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemical reagents used were of analytical grade.

2.2. Samples. Skin fragments were obtained through paraffin-embedded biopsies from the Tissue Bank of the Clinic Hospital at the Federal University of the State of Pernambuco (UFPE), Northeastern Region of Brazil, and diagnosed as basal cell carcinoma (BCC = 17), squamous cell carcinoma

(SCC = 13), keratoacanthoma (KA = 13), and actinic keratosis (AK = 9). The diagnosis of skin neoplasms was performed by Dr. Mariana Silva. The normal human epidermis fragments (NE = 14) were obtained from individuals submitted to plastic surgery and supplied from Hospital Santa Clara, Recife, PE, Brazil. The diagnosis of the cutaneous tumors was based on histopathology. This study was approved by the Health Science Centre Bioethical Board from the Federal University of Pernambuco, Brazil (CEP/CCS/UFPE no. 195/09).

2.3. Lectins Conjugation with AE. Lectins (1 mL containing 2 mg of protein) were incubated with 10 μ L of acridinium ester solution (0.2 mg diluted in 400 μ L of *N,N*-dimethylformamide) for 1 h at 25°C under rotary stirring. The conjugate (lectin-AE) was applied to a column of Sephadex G-25 (10 $\times$ 1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, containing 0.15 M NaCl (PBS), pH 7.2, and eluted with this buffer. Aliquots (1 mL) were collected and their protein content was spectrophotometrically determined at 280 nm. The aliquots corresponding to the protein peak had their chemiluminescence assayed. After conjugation, Con A-AE, PNA-AE, and MAA-AE were evaluated regarding the maintenance of their carbohydrate recognition property (hemagglutinating activity) using glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes and human erythrocytes for UEA-AE according to Beltrão et al. [19]. Protein concentration was measured according to Lowry et al. [20].

2.4. Chemiluminescent Lectin-Histochemistry. Paraffin sections (8 μ m) of samples were cut, transferred to glass slides, deparaffinized in xylene, and rehydrated in graded alcohols (3 $\times$ 100% and 1 $\times$ 70%—10 dips each). Slices were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution at 37°C for 2 min and washed (twice, 5 minutes each time) with 10 mM phosphate buffer saline containing 0.15 M NaCl (PBS). Afterwards, tissue slices were incubated with lectins-AE (100 μ L–100 μ g mL⁻¹) for 2 h at 4°C followed by washings (3 $\times$ 5 min) with 100 mL of PBS. The area corresponding to the tissue section (square-shaped) was defined as 0.25 cm². Then, the tissues were cut and transferred to polypropylene test tubes containing 50 μ L of PBS. Finally, solutions of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 (50 μ L) and 0.25 M NaOH (50 μ L) were added for chemiluminescent measurement using a luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. Triplicate measurements were carried out throughout this study. Lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating each lectin solution with 300 mM methyl- α -D-mannoside (Con A), D-galactose (PNA), α -L-fucose (UEA-I), and *n*-acetylneuraminic acid (MAA) for 45 min at 25°C prior to their incubation with tissues. The following steps were as described previously for the binding protocol.

2.5. Statistical Analysis. The software OriginPro 8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA, USA) was used for the statistical analysis, and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d.). Obtained data

Disease Markers

151

were compared using ANOVA and parametric statistical test of Tukey ($P < 0.05$) through SigmaPlot (CA, USA).

3. Results

Lectins conjugated to acridinium ester (Con A-AE, PNA-AE, UEA-AE, and MAA-AE) were collected by Sephadex G-25 chromatography and their profiles were identical to those previously reported [15]. The superposition of the protein and chemiluminescence peaks indicated that all studied lectins were labeled with the AE. The lectin derivatives were also capable of recognizing their specific carbohydrates according to the hemagglutinating activity.

These lectin derivatives were used to investigate the glycophenotype of cutaneous tumor tissues and the results are displayed in Figure 1. Lower expression of α -D-glucose/mannose was presented for all tumors compared with the normal tissue. AK, KA, SCC, and BCC showed values of RLU equal to $143,694 \pm 28,626$ RLU; $140,704 \pm 29,009$ RLU; $148,238 \pm 38,333$ RLU, and $134,007 \pm 30,537$ RLU, respectively, whereas the normal tissue was $271,435 \pm 64,329$ RLU. The α -L-fucose expression pattern was also lower for cutaneous tumors (RLU values of $11,831 \pm 1,935$ RLU; $28,773 \pm 6,468$ RLU; $14,586 \pm 3,464$ RLU, and $13,880 \pm 2,926$ RLU for AK, KA, SCC, and BCC, resp.) compared with the normal epidermis ($33,743 \pm 5,182$ RLU). On the other hand, they presented higher expression of Gal- β (1-3)-GalNAc compared with the normal skin tissues. AK, KA, SCC, and BCC presented RLU values of $23,766 \pm 2,525$ RLU; $32,567 \pm 6,127$ RLU; $31,172 \pm 5,134$ RLU; and $18,007 \pm 4,618$ RLU, respectively, whereas a value of $7,567 \pm 1,799$ RLU was found for the normal tissue. Actinic keratosis and SCC exhibited higher expression of Neu5Ac- α (2,3)Gal than normal epidermis ($35,687 \pm 8,226$ RLU; $65,370 \pm 16,811$ RLU, and $44,864 \pm 11,644$ RLU, resp.). However, KA ($26,927 \pm 6,942$ RLU) and BCC ($29,836 \pm 6,179$ RLU) showed equal RLU values compared with the normal tissue. The standard deviation of all measurements varied from 10.6% to 25.9% of the mean value.

For all lectins, the mean among RLU values of cutaneous tumors and normal epidermis was significantly different, as observed using parametric statistical test of Tukey. However, statistically significant variations were not observed among RLU values of cutaneous tumors labeled with ConA-AE, AK and KA labeled with PNA-AE, AK and SCC labeled with UEA-AE, and BCC and KA labeled with MAA-AE. Lectins-AE inhibition binding assay using specific carbohydrates (300 mM) resulted in a decrease in RLU values (from 65% to 93%) indicating that unspecific binding between the conjugates and cell surface molecules did not occur.

4. Discussion

In our laboratory, the acridinium ester was used as a marker to *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni* antigens in chemiluminescent immunoassay. By this method, small amounts (nanogram scale) of circulating antibodies were detected in the patients' serum [21]. The glycode of normal, fibroadenoma, and invasive duct carcinoma tissues was

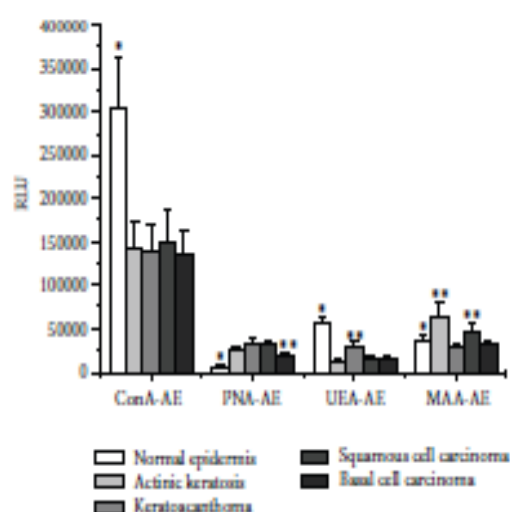


FIGURE 1: Comparison between the chemiluminescence of normal epidermis (NE, $n = 14$), actinic keratosis (AK, $n = 9$), keratoacanthoma (KA, $n = 13$), squamous cell carcinoma (SCC, $n = 13$), and basal cell carcinoma (BCC, $n = 17$) labeled with Con A-AE, PNA-AE, UEA-AE, and MAA-AE. (*) Statistically significant variations were observed among RLU values of cutaneous tumors and normal epidermis. (**) Statistically significant variations were observed among RLU values of cutaneous tumors.

investigated using lectins labeled with AE [15, 22]. Anti-HER-2-AE allowed a reduction in the subjectivity in prognostic and predictive information intrinsic to Her-2 status evaluation in breast tumors [23].

Cell surface glycans are highly related to cell-cell communication, host-pathogen interaction, and cell matrix interactions [24]. Tumor invasion is dependent on a loss of intercellular adhesion and transmigration of cells through the basement membrane (BM) as well as the surrounding extracellular matrix (ECM) [25]. Metastasis is a multistep phenomenon, which involves the loosening of the tumor cells from the primary tumor, the degradation of the extracellular matrix, and the invasion of blood vessels at the site of the primary tumor [6]. These steps require adhesive interactions, which are mediated by cell surface glycans and their interactions with endogenous carbohydrate binding proteins (lectins). Aberrant glycosylation is a key feature of malignant transformation and the glycans involved influence the adhesive interactions of cancer cells often providing favorable conditions for tumor dissemination [26]. The molecular organization and the stability of adherent junctions formation are influenced by the presence of altered glycans on the cell surface, phenotypic change commonly observed in malignancy [27].

Alterations in the expression of glycophenotype between benign and malignant skin lesions have been previously reported through lectin histochemistry and computer image analysis [8]. It is worthwhile to register that they did not compare with normal epidermis and included trichoepithelioma and seborrheic keratosis that were not studied in this work.

These authors reported higher expression of α -D-glucose/mannose (except in SCC) and D-galactose residues in cutaneous tumors. The chemiluminescent α -D-glucose/mannose detection (Con A-AE) corroborated these findings but they were statistically lower than those found for the normal epidermis. They also found high D-galactose residues (PNA) as well as our results except that lower RLU was detected compared to the normal epidermis. Another contradiction was found as far as fucose is concerned. Here fucose was chemiluminescently detected in the tumors that were statistically lower than that estimated for normal epidermis. Therefore, these lectins can be used as markers for distinction among skin lesions; however, the chemiluminescent approach may be more sensitive than that based on computer image analysis of lectin histochemistry.

Smetana et al. [28] reported that laminins, a principal component of BM, exhibit unique saccharidic epitopes (mannose-rich oligosaccharides). Therefore, aberrant α -D-glucose/mannose expression in this protein may modify the adhesive interactions between transformed cells, contributing for the detachment of cancer cells from the primary tumor mass and the acquisition of a more motile and invasive phenotype.

Several common structural changes occur in tumor glycans and can affect interactions between tumor cell-surface glycans and endogenous lectins, which may determine the metastatic potential of the tumor cell, including increases in the level of truncation and branching of structures as well as an increased expression of unusual terminal sequences [29]. These changes often result in an increased exposure of terminal galactose residues such as those found in the cancer-associated T antigen (Gal β 1-3 GalNAc) and the Lewis X trisaccharide (Gal β 1 4(Fuc α 1-3)GlcNAc) [30]. The higher expression of galactose residues observed by high RLU could be related to the potential role of galactose ligands in tumor cell metastasis by the correlation between increased expression of galectin, a family of galactose binding proteins, and the ability of many tumor cell types to metastasize [31].

Fucosylation is one of the most common modifications involving oligosaccharides on glycoproteins or glycolipids. It regulates the biological functions of adhesion molecules and growth factor receptors [32]. In this study, fucosylation pattern changes were observed by the decrease of chemiluminescence signal using UEA-I conjugated to AE for the labeling of cutaneous tumors. AK showed fucosylation pattern similar to malignant lesions and different when compared to benign lesion (KA). This suggests a biochemical similarity with malignant neoplasms and supports the studies claiming that AK and CEC are the same lesion in different degrees of development.

It is known that both integrins and E-cadherin are associated with cancer cells characteristics through regulation of the cell-extracellular matrix interaction and homotypic cell-cell adhesion, respectively [33]. Zhao et al. [34] showed that core fucosylation is essential for the function of α 3 β 1 integrin, a protein that connects many biological functions such as development, control of cell proliferation, and protection against apoptosis and malignant transformation. Osumi et

al. [35] suggested a possible core fucosylation role in cell-cell adhesion regulation in cancer. Therefore, based on the information above, it can be concluded that fucose would be involved in the biological behavior of cancer cells through functions regulation of many membrane associated proteins.

Sialic acids (Sias) are typically the outermost monosaccharide units on the glycan chains of glycolipids and glycoproteins and usually occur as a terminal component at the nonreducing end of their carbohydrate chains [36]. Due to its terminal localization on glycans and the variety of linkages to the underlying sugar chain, sialic acid has been utilized by a wide variety of Sia-binding proteins, mainly viral and bacterial pathogens proteins, selectins, and siglecs [37].

The increase in the expression of Neu5Ac- α (2,3)Gal between benign and malignant lesions of skin, AK, and SCC, respectively, was observed by the increase of RLU values. The differences in the sialylation degree of glycoconjugates on a tumor cell surface of SCC may play an important role in the process of cell malignization and metastasis [38]. Vural et al. [39] reported the increase of total sialic acid (TSA) levels between patients with AK and controls, probably related to increased turnover of cells [40]. Plzak et al. [13] observed that differentiated squamous cell carcinoma expresses 2,3-linked-NeuAc residues (recognized by lectin MAA) and the poorly differentiated squamous cell carcinoma 2,6-linked-NeuAc (recognized by *Sambucus nigra* agglutinin).

Sialyl-glycoconjugates may regulate the interaction of cancer cells with other cells and with the cell matrix. These molecules may be responsible for adhesion as well as antiadhesion and for extending the survival time of cancer cells in the blood stream. Moreover, sialic acid may also be involved in growth regulation [41].

From the results presented in this work one can assume that the chemiluminescent lectin-histochemistry approach allows the glycophenotype direct quantitative evaluation of skin tumors combining the specificity lectin-carbohydrates interaction and sensitivity of chemiluminescent assay. Despite that the number of analyzed samples (*n* values) does not permit a definitive assumption as far as diagnosis is concerned the statistical analyses showed glycophenotype alterations according to the cutaneous tumors. Furthermore, although paraffin-embedded skin fragments were obtained from different individuals and sections were cut from them, acceptable mean dispersion values (standard variation range of 10.6%–25.9%) were observed. Higher expression of β -Gal (1-3)-GalNAc and Neu5Ac- α (2,3)Gal as well as lower expression of α -D-glucose/mannose and α -L-fucose residues was evidenced by differences in RLU values. These results confirm the importance of lectins as potential biomarkers for detection of changes in glycophenotype of skin neoplasms. Furthermore, this procedure is an effective tool to eliminate subjective analyses of microscopic preparations.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq, CAPES, and FACEPE (Brazilian scientific agencies). The authors thank Carmelita Bezerra de Lima Cavalcanti and Otaviano Tavares da Costa

for technical assistances. They also thank Dr. Tatiana Caloi and Dr. Mariana Silva for providing the human normal epidermis fragments and the cutaneous tumor histopathological diagnoses, respectively.

References

- [1] H. Ghazarian, B. Itoni, and S. B. Oppenheimer, "A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics," *Acta Histochemica*, vol. 113, no. 3, pp. 236–247, 2011.
- [2] B. Adamczyk, T. Tharmalingam, and P. M. Rudd, "Glycans as cancer biomarkers," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1820, no. 9, pp. 1347–1353, 2012.
- [3] Y. Mechref, Y. Hu, A. Garcia, and A. Hussein, "Identifying cancer biomarkers by mass spectrometry-based glycomics," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 12, pp. 1755–1767, 2012.
- [4] M. M. Fuster and J. D. Esko, "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 7, pp. 526–542, 2005.
- [5] M. Herling, J. Knolle, H. Bahn et al., "Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis," *In Vivo*, vol. 14, no. 4, pp. 499–506, 2000.
- [6] A. Thies, I. Moll, J. Berger, and U. Schumacher, "Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation," *British Journal of Cancer*, vol. 84, no. 6, pp. 819–823, 2001.
- [7] A. Thies, A. Berlin, G. Brunner et al., "Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases," *Cancer Letters*, vol. 248, no. 1, pp. 68–80, 2007.
- [8] M. R. Melo Júnior, J. L. S. Araújo Filho, V. J. R. M. Patu, M. C. F. P. Machado, E. I. C. Beltrão, and L. B. Carvalho Júnior, "Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis," *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, vol. 42, no. 6, pp. 455–460, 2006.
- [9] T. Basarab, G. Orchard, and R. Russell-Jones, "The use of immunostaining for bcl-2 and CD34 and the lectin peanut agglutinin in differentiating between basal cell carcinomas and trichoepitheliomas," *American Journal of Dermatopathology*, vol. 20, no. 5, pp. 448–452, 1998.
- [10] A. Roda, M. Mirasoli, D. Melucci, and P. Reschiglian, "Toward multianalyte immunoassays: a flow-assisted, solid-phase format with chemiluminescence detection," *Clinical Chemistry*, vol. 51, no. 10, pp. 1993–1995, 2005.
- [11] J. L. S. Araújo Filho, M. R. Melo Júnior, and L. B. Carvalho Júnior, "Potential applications of the chemiluminescent methods in tumoral diseases investigation," *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 392–400, 2011.
- [12] A. Natrajan, D. Sharpe, J. Costello, and Q. Jiang, "Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output," *Analytical Biochemistry*, vol. 406, no. 2, pp. 204–213, 2011.
- [13] J. Plzák, K. Smetana Jr., M. Chovanec, and J. Betka, "Glycobiology of head and neck squamous epithelia and carcinomas," *Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 67, no. 2, pp. 61–69, 2005.
- [14] A. Fan, Z. Cao, H. Li, M. Kai, and J. Lu, "Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses," *Analytical Sciences*, vol. 25, no. 5, pp. 587–597, 2009.
- [15] V. P. Brustein, C. L. B. Cavalcanti, M. R. Melo Júnior, M. T. Correia, E. I. C. Beltrão, and L. B. Carvalho Júnior, "Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 166, no. 2, pp. 268–275, 2011.
- [16] L. J. Kricka, "Clinical applications of chemiluminescence," *Analytica Chimica Acta*, vol. 500, no. 1–2, pp. 279–286, 2003.
- [17] D. W. King, W. J. Cooper, S. A. Rusak et al., "Flow injection analysis of H₂O₂ in natural waters using acridinium ester chemiluminescence: method development and optimization using a kinetic model," *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 11, pp. 4169–4176, 2007.
- [18] C. Ricotti, N. Bouzari, A. Agadi, and C. J. Cockerell, "Malignant skin neoplasms," *Medical Clinics of North America*, vol. 93, no. 6, pp. 1241–1264, 2009.
- [19] E. I. Beltrão, M. T. S. Correia, J. F. Silva, and L. C. B. B. Coelho, "Binding evaluation of Isoform I from Cratylomollislectin to human mammary tissues," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 74, no. 3, pp. 125–134, 1998.
- [20] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [21] R. A. L. Coelho, G. A. Jaques, A. D. Barbosa et al., "Magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite as solid-phase in chemiluminescent assays," *Biotechnology Letters*, vol. 24, no. 20, pp. 1705–1708, 2002.
- [22] L. M. Campos, C. L. B. Cavalcanti, J. L. Lima-Filho, L. B. Carvalho, and E. I. C. Beltrão, "Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker," *Biomarkers*, vol. 11, no. 5, pp. 480–484, 2006.
- [23] M. J. B. M. Rêgo, M. F. Cordeiro, C. L. B. Cavalcanti, L. B. Carvalho Júnior, and E. I. C. Beltrão, "Imunohistoquimiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation," *Disease Markers*, vol. 34, no. 5, pp. 373–377, 2013.
- [24] S. M. Zhou, L. Cheng, S. J. Guo, H. Zhu, and S. C. Tao, "Lectin microarrays: a powerful tool for glycan-based biomarker discovery," *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, vol. 14, no. 8, pp. 711–719, 2011.
- [25] B. Schnegelsberg, U. Schumacher, and U. Valentiner, "Lectin histochemistry of metastasizing and non-metastasizing breast and colon cancer cells," *Anticancer Research*, vol. 31, no. 5, pp. 1589–1597, 2011.
- [26] N. D. S. Rambaruth and M. V. Dwek, "Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis," *Acta Histochemica*, vol. 113, no. 6, pp. 591–600, 2011.
- [27] B. T. Jamal, M. Nita-Lazar, Z. Gao, B. Amin, J. Walker, and M. A. Kukuruzinska, "N-glycosylation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct β -catenin and γ -catenin-containing AJs," *Journal of Cell Health and Cytoskeleton*, vol. 2009, no. 1, pp. 67–80, 2009.
- [28] K. Smetana Jr., J. Plzák, B. Dvoránková, and Z. Holíková, "Functional consequences of the glycophenotype of squamous epithelia—practical employment," *Folia Biologica*, vol. 49, no. 3, pp. 118–127, 2003.
- [29] Y. J. Kim and A. Varki, "Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer," *Glycoconjugate Journal*, vol. 14, no. 5, pp. 569–576, 1997.
- [30] A. S. Powlesland, P. G. Hitchen, S. Parry et al., "Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation," *Glycobiology*, vol. 19, no. 8, pp. 899–909, 2009.
- [31] Y. Takenaka, T. Fukumori, and A. Raz, "Galectin-3 and metastasis," *Glycoconjugate Journal*, vol. 19, no. 7–9, pp. 543–549, 2002.

- [32] E. Miyoshi, K. Moriwaki, and T. Nakagawa, "Biological function of fucosylation in cancer biology," *Journal of Biochemistry*, vol. 143, no. 6, pp. 725–729, 2008.
- [33] K. Moriwaki and E. Miyoshi, "Fucosylation and gastrointestinal cancer," *World Journal of Hepatology*, vol. 2, no. 4, pp. 151–161, 2010.
- [34] Y. Zhao, S. Itoh, X. Wang et al., "Deletion of core fucosylation on $\alpha 3 \beta 1$ integrin down-regulates its functions," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 50, pp. 38343–38350, 2006.
- [35] D. Osumi, M. Takahashi, E. Miyoshi et al., "Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells," *Cancer Science*, vol. 100, no. 5, pp. 888–895, 2009.
- [36] F. Lehmann, E. Tiralongo, and J. Tiralongo, "Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, no. 12, pp. 1331–1354, 2006.
- [37] N. M. Varki and A. Varki, "Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease," *Laboratory Investigation*, vol. 87, no. 9, pp. 851–857, 2007.
- [38] W. Bergler, F. Riedel, R. Schwartz-Albiez, H. J. Gross, and K. Hörmann, "A new histobiochemical method to analyze sialylation on cell-surface glycoproteins of head and neck squamous-cell carcinomas," *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 254, no. 9-10, pp. 437–441, 1997.
- [39] P. Vural, M. Canbaz, and D. Selçuki, "Total and lipid-bound Sialic acid levels in actinic keratosis and basal cell carcinoma," *Turkish Journal of Medical Sciences*, vol. 29, pp. 419–423, 1999.
- [40] S. I. Hakamory, "Tumor-associated carbohydrate antigens," *Annual Review of Immunology*, vol. 2, pp. 103–126, 1984.
- [41] K. L. Carraway, N. Fregien, K. L. Carraway III, and C. A. C. Carraway, "Tumor sialomucin complexes as tumor antigens and modulators of cellular interactions and proliferation," *Journal of Cell Science*, vol. 103, no. 2, pp. 299–307, 1992.

CAPÍTULO 2

Artigo submetido ao periódico Journal of Molecular Biology

Fator de Impacto: 4,33

Qualis Capes: A1

**LECTIN-CARBOHYDRATE COMPLEX EVALUATION BY
CHEMILUMINESCENCE**

Luiza Rayanna Amorim de Lima¹, Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva¹,
Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{1,2}, Thiago Barbosa Cahú¹, Eduardo Isidoro
Carneiro Beltrão¹, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^{1*}

¹Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
(LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030
Recife, Pernambuco, Brazil.

²Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG),
Universidade de Pernambuco (UPE), 50100 Garanhuns, PE, Brazil.

Short title: **LECTIN-CARBOHYDRATE COMPLEX EVALUATION**

*Corresponding author. Fone: +55 81 21268484 Fax: +55 81 21268485.
Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária, Recife 50030, Pernambuco, Brasil. E-mail address:
lbcj@hotmail.com.br (Luiz B. de Carvalho Júnior).

Abstract

Here, the lectin-carbohydrate interaction was chemiluminescently investigated using lectins conjugated to acridinium ester (AE) and polysaccharides composed of their respective specific carbohydrates. Concavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA) and peanut agglutinin (PNA) were labeled to AE. There was a linear relationship between chemiluminescence and lectin-AE concentration from which RLU was converted to μg of lectin. Con-AE, WGA-AE and PNA-AE were respectively incubated with discs ($0,0314 - 0,6358 \text{ cm}^2$) of phytigel (containing glucose), chitosan (containing deacetylated and acetylated D-glucosamine) and carrageenan (containing galactose), their chemiluminescences established and expressed as Relative Light Unit (RLU). Lectin-AE-polysaccharide chemiluminescence was reduced by either their specific sugar or by previous incubation with non-labeled lectins. The complex formation chemiluminescently detected followed the Langmuir isotherm from which constants were estimated. The association constant (K_a) and maximum binding sites on the membranes were $2.4 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \pm 0.8 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ and $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Con A); $0.9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ and $0.021 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0.003 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (WGA) and $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \pm 0.9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ and $0.069 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0.010 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{mg}^{-1}$ (PNA).

Keywords: carbohydrates; chemiluminescence; lectins; lectin-carbohydrate complex; polysaccharide.

1. Introduction

The interaction between glycans and lectins is important issue in several biological phenomena such as: cell-cell recognition, cell-extracellular matrix interactions, gamete fertilization, embryonic development, cell growth, cell differentiation, cell signaling, cell adhesion and migration, apoptosis, immunomodulation and inflammation, host-pathogen interactions, glycoprotein folding and routing, mitogenic induction and homeostasis [1].

The evaluation of lectin-carbohydrate interaction strength can be established by the parameters: affinity (K_a), dissociation (K_d) and equilibrium constants (K_a/K_d). They provide information on the binding energy and qualitative measure of binding affinity, useful for comparisons [2 – 4].

Numerous analytical and bioanalytical techniques have been used for studying molecular interactions between proteins and carbohydrates, such as dual polarization interferometry [5], enzyme-linked lectin assay (ELLA) [6], impedance spectroscopy [7], quartz crystal microbalance (QCM) [8], microarray techniques [9], surface plasmon resonance (SPR) [3], X-ray and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [10].

Here, an additional procedure is proposed: chemiluminescence (CL). This method represents powerful analytical tool providing high detectability [11, 12], allowing low limits of detection (attomole-zeptomole) and rapid assays [13]. This technique has been used in quantitative analysis of proteins [14], nucleic acids [15] and cell surface glycans [16]. The CL application in analytical chemistry relies on coupling of substance of interest to one of the participants of chemiluminescent reaction or product in the excited state. The sample concentration will be proportional to total light production emitted [17].

In our laboratory tissue glycophenotype has been investigated using lectins labeled to acridinium ester (N-hydroxysuccinimide-activated dimethyl acridinium ester: DMAE-NHS/1966-1-53-2/Organic Lab), from now on abbreviated as AE, followed by chemiluminescent assay [18 – 22].

In order to investigate further the chemiluminescent analysis of the lectin-carbohydrate complex formation a model is here proposed based on lectins conjugated to AE interacting to polysaccharides composed of their specific carbohydrates. The theoretical approach of this investigation was based on the Langmuir adsorption model.

2. Experimental

2.1 Reagents

N-hydroxysuccinimide-activated dimethyl acridinium ester (DMAE-NHS)/1966-1-53-2/Organic Lab. Concanavalin A (Con A), Peanut agglutinin (PNA), Wheat germ agglutinin (WGA), N,N-dimethylformamide, methyl- α -D-mannoside, D-galactose, N-acetyl-D-glucosamine, phytigel, carrageenan, chitosan and Sephadex G-25 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chemiluminescent detection was performed using Siemens Reagent TSH 500T (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Malvern; PA; USA) composed of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 and 0.25 M NaOH. All other chemical reagents used were of analytical grade.

2.2 Lectins conjugation to AE

Con A, PNA and WGA (1 mL containing 2 mg of protein) were, separately, incubated with 10 μ L of acridinium ester solution (0.2 mg diluted in 400 μ L of N,N-dimethylformamide) for 1 h at 25 °C under rotary stirring. The conjugate (Con A-AE, PNA-AE and WGA-AE) was applied to a column of Sephadex G-25 (10 x 1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, containing 0.15 M NaCl (PBS), pH 7.2, and eluted with this buffer. Aliquots (1 mL) were collected and their protein content, chemiluminescence and hemagglutinating activity were established, respectively, by spectrophotometry (280 nm), according to the item 2.4. and to [23]. The aliquots corresponding to the protein content, chemiluminescence and hemagglutinating activity peak were pooled and used throughout this work.

2.3 Preparations chitosan, phytagel and carrageenan discs

Purified chitosan was dissolved in acetic acid 3% (v/v) and the solution (20 mg mL⁻¹) was distributed on wells measuring either 128 mm x 85 mm x 22 mm or 128 mm x 85 mm x 17 mm (lid of tissue culture plate). The plates remained overnight at 37°C. The chitosan discs then were neutralized with 0.3 M ethanolic solution in 1 M NaOH. Thereafter, the discs were washed with distilled water and dried at 37°C. Aqueous gels of phytagel (5 mg mL⁻¹) and carrageenan (10 mg mL⁻¹) were prepared in distilled water by stirring on a magnetic stirrer. However, carrageenan gel was heated for 30 min at 70°C during the process. The gels were distributed on cover of tissue culture plate (24 and 96 wells) and remained overnight at 37°C. The three membranes were cut using homemade molds yielding circle-shape discs with areas from 0.0314 to 0.6358 cm².

2.4 Lectin-carbohydrate interaction chemiluminescent evaluation.

Polysaccharides discs were incubated with Con A-AE, WGA-AE and PNA-AE (100 μ L 100 μ g mL⁻¹) for 2h at 4 °C followed by washings with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 145 mM NaCl, from now on abbreviated as PBS. Afterwards, the discs were transferred to polypropylene test tubes containing 50 μ L of PBS. Finally, solutions of 0.5% H₂O₂ in 0.1 N HNO₃ (50 μ L) and 0.25 M NaOH (50 μ L) were added for chemiluminescent measurement using a luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA). The emission intensity was expressed as relative light unit (RLU) with a counting time of 5 s per sample. Triplicate measurements were carried out throughout this study.

2.5 Inhibition assays

Lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating each lectin-AE solution with 300 mM methyl- α -D-mannoside (Con A-AE), N-acetyl-D-glucosamine (WGA-AE) and D-galactose (PNA-AE) for 45 min at 25°C prior to their incubation with the polysaccharide discs (monosaccharide inhibition). The following steps were as previously described for the binding protocol (item 2.4). Lectin binding inhibition assays were also performed by non-labeled lectin inhibition. The polysaccharide discs were previously incubated with the non-labeled lectins (100 μ L 100 μ g mL⁻¹) washed with PBS and afterwards incubated with the lectins-AE. Then their chemiluminescences were detected as described in the item 2.4.

2.6 Mathematical and statistical analysis

The software OriginPro 8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) was used for the mathematical and statistical analysis and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d.).

3. Results

Phytigel is a polymer composed of glucuronic acid, rhamnose and glucose; chitosan is a linear polysaccharide composed of randomly distributed β -(1-4)-linked D-glucosamine (deacetylated unit) and N-acetyl-D-glucosamine (acetylated unit) whereas carrageenans are high-molecular-weight polysaccharides made up of repeating galactose units and 3,6 anhydrogalactose (3,6-AG), both sulfated and nonsulfated. Therefore, membranes prepared with Phytigel, chitosan and carrageenan contain, respectively, glucose, N-acetyl-D-glucosamine and galactose that are specifically recognized by Con A, WGA and PNA.

Figure 1 shows the linearity between the RLU *versus* lectin-AE amount from which RLU was converted to μg of lectin: Con A-AE = $(\text{RLU} - 18,192)/10,884$; WGA-AE = $(\text{RLU} + 20,768)/833$ and PNA-AE = $(\text{RLU} - 20,246)/5,676$.

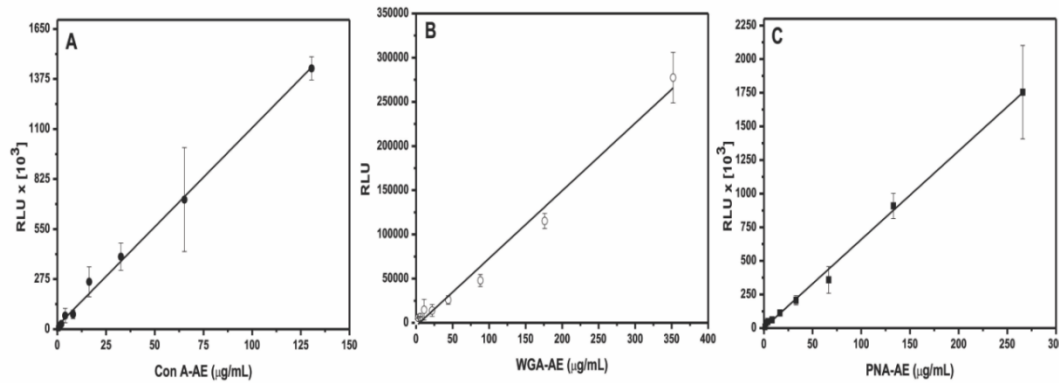


Figure 1. Relation between the RLU and Con A-AE (a), WGA-AE (b) and PNA-AE (c) amount. The linear correlation allowed converting RLU to moles of lectins.

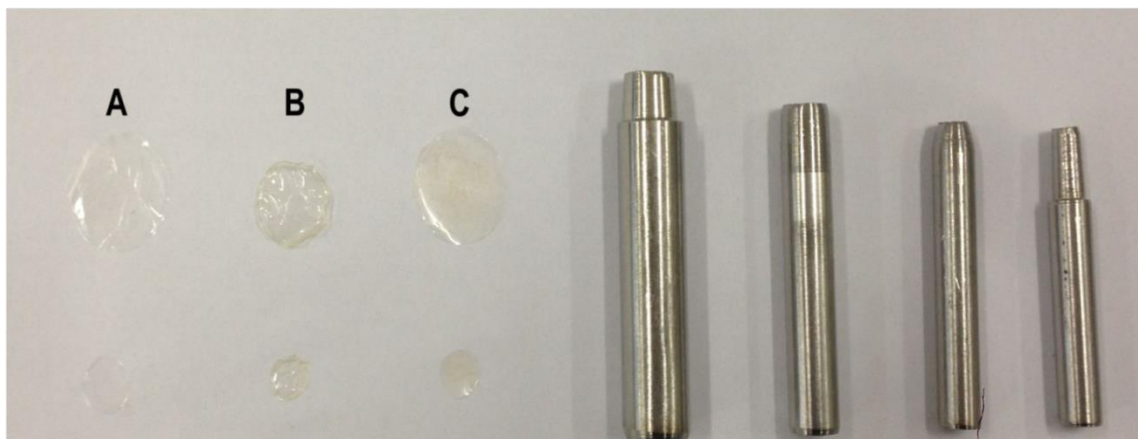


Figure 2. Membranes synthesized with phytigel (A), chitosan (B) and carrageenans (C) and their discs (below) produced by using homemade molds (right).

Figure 2 displays the membranes of phytigel (A), chitosan (B) and carrageenan (C) as well as the circle-shape discs (below the membranes) produced by cutting the membranes using the homemade molds (left).

To assure the specificity of photon emitted from the lectins-AE/polysaccharide complexes two set of experiments were carried out: 1) previously incubating the lectin-AE with its respective carbohydrates (monosaccharide inhibition) and 2) the membranes were previously treated with non-labeled lectins before incubation with the lectins-AE conjugates (non-labeled lectin inhibition). Figure 3 shows the results for the three used lectins-AE inhibited by their monosaccharide sugars and their non-labeled preparations. The results showed much lower RLU after both inhibition experiments compared to the lectins-AE/polysaccharide complexes.

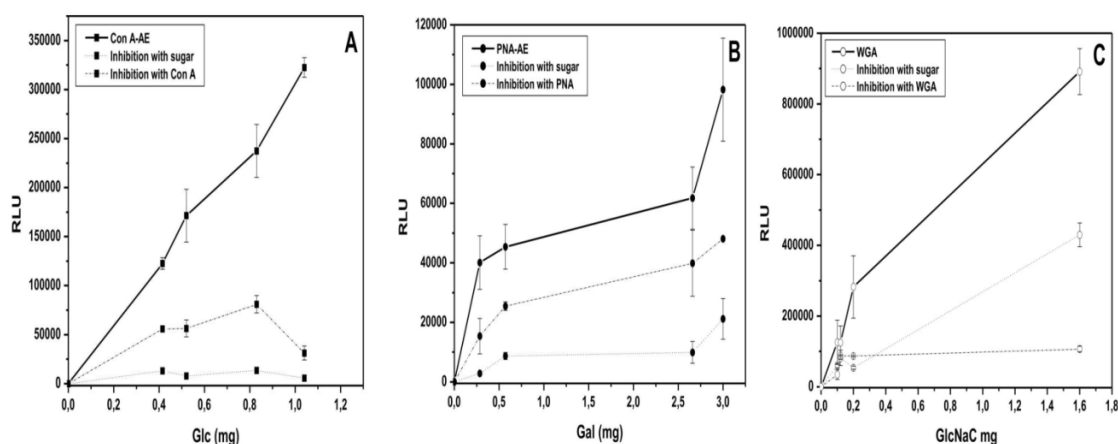


Figure 3. Lectin binding inhibition assay on membranes. Con A-AE (A), WGA-AE (B) and PNA-AE (C) were either previously inhibited with methyl- α -D-mannopyranoside, N-acetyl-D-glucosamine and D-galactose, respectively, or inhibited with non-labeled lectins.

Figure 4 displays the relationship between lectins-AE complexed to the polysaccharide disc *versus* sugars presents in the polysaccharide disc. Membrane areas (ranging from 0.0314 cm² to 0.6358 cm²) in the x-axis of this Figure were replaced by the sugar amounts estimated by their compositions.

The curves statistically calculated were hyperbolic for all three lectins. From these results and using the Langmuir isotherm one can estimate the constants K_a and the maximum value of lectin bound to the polysaccharide membrane and the constant related to the energy of adsorption. Table 1 summarizes the constant values estimated from the results of Figure 4 and using the Langmuir isotherm. From this Table one can estimated the affinity constants and how many sugar molecules were available for lectin-AE binding in each polysaccharide membrane.

Table 1. Constant values α calculated from hyperbolic curves using equation 1.

Lectin	Polysaccharide	Q_m M	K_L Moles/mg carbohydrate
Con A	Phytigel	$24.6421 \pm 8.254 \times 10^{-6}$	$1.352 \pm 0.349 \times 10^{-3}$
WGA	Chitosan	$0.91394 \pm 0.4427 \times 10^{-6}$	$0.021 \pm 0.003 \times 10^{-3}$
PNA	Carrageenan	$2.056 \pm 0.92 \times 10^{-6}$	$0.069 \pm 0.010 \times 10^{-3}$

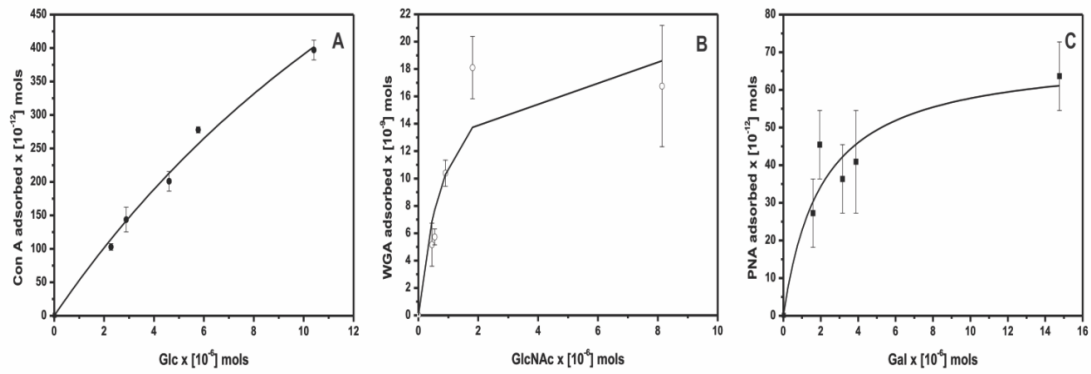


Figure 4. Relationship between RLU *versus* offered Con A-AE (A), WGA-AE (B) and PNA-AE (C). Membrane areas ranged from 0.0314 – 0.6358 cm² and the sugar contents were converted to μ g from the polysaccharide composition.

Table 2 resumes the Con A K_a constant reported in the literature for Methyl- α -D-mannopiranoside, mannose and mannan based on different methods. These values varied according to the method ranging from 10^{-4} M^{-1} to 10^{-6} M^{-1} but higher than the one estimated by chemiluminescence and for phytigel ($2.46 \times 10^{-7} \pm 0.82 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$).

Table 2. Constant values of association (K_a) and dissociation (K_d) found to lectins using different analytical methods.

Carbohydrate	Constants	Method	Reference
methyl- α -D-mannopiranoside	$K_a = 0.79 \pm 0.04 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$	Surface Plasmon Resonance	[28]
methyl- α -D-mannopiranoside	$K_a = 0,82 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$	Titration Microcalorimetry	[29]
Mannose	$K_d = 12,88 \text{ nM}$	Colorimetric Assay	[30]
Mannose	$K_a = 4.3 \pm 0.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	Luminescent Assay	[31]
Mannose	$K_a = 0.59 \pm 0.01 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Quartz crystal Microbalance	[32]
Mannan	apparent bind constant = $0,4 \text{ }\mu\text{M}$	Quartz crystal Microbalance cristal de quartzo	[33]

4. Discussion

Tissue glycophenotype investigated in our laboratory using lectins labeled to AE followed by chemiluminescent assay showed relationship between RLU and tissue area [18 – 22]. Linear and/or hyperbolic relationships were observed. The explanation for the proportional can be attributed to the amount of lectin-carbohydrate complex formed in the evaluated tissues. These results indicated that the area of tissue is an important parameter in the chemiluminescent reaction rate when lectins are used as histochemical probes. Therefore, additional information can be deduced from these relationships established chemiluminescently.

The interaction between lectin and tissue glycans resembles the one with a polymer contains its specific carbohydrate. In this contribution the mathematical approach to investigate the lectin-carbohydrate interaction was inspired on Langmuir adsorption model. In 1918, He proposed a theory to explain the molecules adsorption by assuming the adsorbate behaves as an ideal gas at isothermal conditions on a uniform surface, simple, infinite and non-porous; and forming a monolayer covering the entire surface [24]. Here, one can assume that the lectin absorption on either a polymer composed of its specific substrate or a tissue containing this carbohydrate resembles the conditions idealized by Langmuir.

The Langmuir isotherm is formally equivalent to the Hill equation in biochemistry. Let us use the symbols of this latter equation – Equation 1:

$$\Phi = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} = \frac{[L]^n}{(K_A)^n + [L]^n}$$

Where:

Φ : Fraction of the ligand-binding sites on the receptor protein that are occupied by the ligand;

$[L]^n$: Free (unbound) ligand concentration;

K_d : Apparent dissociation constant derived from the law of mass action (equilibrium constant for dissociation);

K_A : Ligand concentration producing half occupation (ligand concentration occupying half of the binding sites).

n : Hill coefficient, describing cooperativity (or possibly other biochemical properties, depending on the context in which the Hill equation is being used)

The lectins Con A-AE, WGA-AE and PNA-AE were incubated with the polysaccharides of glucose (phytagel), N-acetyl-D-glucosamine (chitosan) and galactose (carrageenan), respectively. Therefore, applying Equation 1 symbols will be Φ : Fraction of the sites on the polysaccharide that are occupied by the lectin; $[L]^n$: Free (unbound) lectin concentration; K_d : equilibrium constant for dissociation and K_A : lectin concentration producing half occupation (lectin concentration occupying half of the polysaccharide sites). Lectins (unbound and bound) would be easily calculated by chemiluminescence.

Exposure of AE labeling the lectin to an alkaline hydrogen peroxide solution triggers a flash of light. AE forms an unstable dioxetane yielding N-methylacridone and produces light at a wavelength of 470 nm [25]. Similarly, this model could be applied to the interaction between the lectins and tissues. However, the microenvironment would be different in these situations as well as the soluble sugar and the parameters estimated from this model must be cautiously interpreted.

In our lab, Con A-AE was incubated to biopsies of normal and infiltrating duct carcinoma (IDC) of mammary tissues. The photon emission from the lectin-acridinium ester-tissue detected and expressed in RLU. The RLU values described a linear relationship with the labeled tissue area in the range 0.125 - 1.0 cm² ($r=0.98$) [18]. This relationship RLU emission *versus* tissue area was confirmed for IDC afterwards [20]. However, hyperbolic curves were described for fibroadenoma using Con A-AE and for both fibroadenoma and IDC tissues using PNA-AE.

It is worthwhile to register that similar performance was observed when antibodies conjugated to AE replaced the lectins. The Her-2 (Human Epidermal

Growth Factor Receptor 2) *status* in breast cancer was chemiluminescently evaluated by using anti-Her-2 antibody conjugated to AE [21]. The RLU from anti-Her-2-acridinium ester showed a tissue-area-relationship. The proportional increase in RLU with tissue area, observed in all groups analyzed, is related to increase in the amount of antigen-antibody complex formation in tissue areas evaluated.

Monoclonal antibody anti-Galectin 3 was also conjugated to AE and the complex formed with Galectin 3 in the prostate tissue was chemiluminescently detected [19]. A linear relationship was also observed between RLU and tissue area.

To apply the present model to investigate the interaction between lectins and tissues must be cautiously interpreted because the microenvironments are completely different regarding tissues and polysaccharides membranes.

From the above results one can assume that there is a linear correlation between the lectin amount and its chemiluminescences after being covalently linked to acridinium ester; the lectin bind specifically to the polysaccharide membrane containing its specific carbohydrate; this binding phenomenon followed the Langmuir isotherm from which the maximum sugar present on the membrane available to the lectin binding and the affinity binding can be estimated.

5. Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq (307273/2013-0 and 473971/2012-7.) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco -

FACEPE (APQ-1399-2.08/12). Authors thank to Carmelita Bezerra de Lima Cavalcanti and Otaviano Tavares da Costa for technical assistances as well as Dr. H. H. Weetall who kindly supplied the acridinium ester.

6. References

- 1 Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.* 2011; 113: 236-254.
- 2 Lee RT, Shinohara Y, Hasegawa Y, Lee YC. Lectin-Carbohydrate Interactions: Fine Specificity difference Between Two Mannose-Binding Proteins. *Biosci. Rep.* 1999; 19: 283-292.
- 3 Linman MJ, Taylor JD, Yu H, Chen X, Cheng Q. Surface plasmon resonance study of protein-carbohydrate interactions using biotinylated sialosides. *Anal. Chem.* 2008; 80: 4007-4013.
- 4 Bombarda E, Ullmann GM. pH-dependent pKa values in proteins--a theoretical analysis of protonation energies with practical consequences for enzymatic reactions. *J. Phys. Chem. B.* 2010; 114:1994-2003.
- 5 Ricard-Blum S, Peel LL, Ruggiero F, Freeman NJ. Dual polarization interferometry characterization of carbohydrate-protein interactions. *Anal. Biochem.* 2006; 352: 252-9.
- 6 Wu JH, Singh T, Herp A, Wu AM. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the Ricinus communis toxic protein (ricin). *Biochim.* 2006; 88: 201-217.

- 7 La Belle JT, Gerlach JQ, Svarovsky S, Joshi L. Label-free impedimetric detection of glycan-lectin interactions. *Anal. Chem.* 2007; 79: 6959-6964.
- 8 Shen Z, Huang M, Xiao C, Zhang Y, Zeng X, Wang PG. Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. *Anal. Chem.* 2007; 79: 2312-9.
- 9 Liang PH, Wang SK, Wong CH. Quantitative analysis of carbohydrate-protein interactions using glycan microarrays: determination of surface and solution dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129: 11177-11184.
- 10 Ardá A, Cañada FJ, Nativi C, Francesconi O, Gabrielli G, Ienco A, Jiménez-Barbero J, Roelens S. Chiral diaminopyrrolic receptors for selective recognition of mannosides, part 2: a 3D view of the recognition modes by X-ray, NMR spectroscopy and molecular modeling. *Chem.* 2011; 17: 4821-9.
- 11 Roda M, Mirasoli D, Melucci D, Reschiglian P. Toward multianalyte immunoassays: a flow-assisted, solid-phase format with chemiluminescence detection. *Clin. Chem.* 2005; 51: 1993-5.
- 12 Araújo-Filho LJS, Melo-Júnior MR, Carvalho Júnior LB. Potential applications of the chemiluminescent methods in tumoral diseases investigation. *Int. J. Pharm. Biosci.* 2011; 2: 392-400.
- 13 Natrajan A, Sharpe D, Costello J, Jiang Q. Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. *Anal. Biochem.* 2010; 406: 204-13.
- 14 Guardigli M, Marangi M, Casanova S, Grigioni WF, Roda E, Roda A. Chemiluminescence quantitative immunohistochemical determination of MRP2 in liver biopsies. *J. Histochem. Cytochem.* 2005; 53: 1451-7.

- 15 Fan A, Cao Z, Li H, Kai M, Lu J. Chemiluminescence Platforms in Immunoassay and DNA Analyses. *Anal. Sci.* 2009; 25: 587-97.
- 16 Lima LRA, Bezerra MF, Almeida SMV, Silva LPBG, Beltrão EIC, Carvalho Júnior LC. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. *Dis. Markers.* 2013; 35: 149-54.
- 17 Campbell AK, Hallet MB, Weeks I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. *Methods Biochem. Anal.* 1985; 31: 317-416.
- 18 Campos LM, Cavalcanti CL, Lima-Filho JL, Carvalho Jr LB, Beltrão EIC. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers.* 2006; 5: 480-4.
- 19 Araújo-Filho JL, Melo-Junior MR, Beltrão EIC, Lima LRA, Antunes CB, de Carvalho Jr LB. Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013; 6: 1861-7.
- 20 Brustein VP, Cavalcanti CL, de Melo-Junior MR, Correia MT, Beltrão EI, Carvalho Jr LB. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012; 166: 268-75.
- 21 Rêgo MJBM, Cordeiro MF, Cavalcanti CLB, Carvalho Júnior LB, Beltrão EIC. Imunohistoquimiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Dis. Markers.* 2013; 34: 373-77.
- 22 Silva LP, Almeida SM, Lima LR, Cavalcanti CL, Lira MMM, Silva MP, Beltrão EI, Carvalho Júnior LB. Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014; 7: 3800-8.

- 23 Beltrão EIC, Correia MTS, Silva JF, Coelho LCBB. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998; 74: 125-34.
- 24 Amuda OS, Giwa AA, Bello IA. Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified activated coconut shell carbon. *Biochem. Eng. J.* 2007; 36: 174-81.
- 25 King DW, Cooper WJ, Rusak SA, Peake BM, Kiddle JJ, O'Sullivan DW, Melamed ML, Morgan CR, Theberge SM. Flow Injection Analysis of H₂O₂ in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development and Optimization Using a Kinetic Model. *Anal. Chem.* 2007; 79: 4169-76.
- 26 Jeyaprakash AA, Katiyar S, Swaminathan CP, Sekar K, Surolia A, Vijayan M. Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an x-ray and modeling study. *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 217–28.
- 27 Murthy BN, Sinha S, Surolia A, Indi SS, Jayaraman N. SPR and ITC determination of the kinetics and the thermodynamics of bivalent versus monovalent sugar ligand-lectin interactions. *Glycoconjugate. J.* 2008; 25: 313-21.
- 28 Safina G, Duran IB, Alasel B, Danielsson B. Surface plasmon resonance for real-time study of lectin–carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins. *Talanta.* 2011; 84: 1284–90.
- 29 Gupta D, Dam TK, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamics of Lectin-Carbohydrate Interactions. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 6388-92.

- 30 Chuang YJ, Zhou X, Pan Z, Turchi C. A convenient method for synthesis of glyconanoparticles for colorimetric measuring carbohydrate-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009; 389: 22–7.
- 31 Rodríguez EM, Bogdan N, Capobianco JA, Orlandi S, Cavazzini M, Scalera C, Quici S. A highly sensitive luminescent lectin sensor based on an α -D-mannose substituted Tb³⁺ antenna complex. *Dalton Trans*. 2013; 43: 9453–61.
- 32 Lebed K, Kulik AJ, Forró L, Lekka M. Lectin-carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance. *J. Colloid. Interface. Sci*. 2006; 299: 41-8.
- 33 Pei Z, Anderson H, Aastrup T, Ramström O. Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of quartz crystal microbalance. *Biosens. Bioelectron*. 2005; 21: 60-6.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento do método histoquimiluminescente, a partir da conjugação de lectinas ao éster de acridina, permitiu a avaliação quantitativa direta da expressão de carboidratos em neoplasias de pele, combinando a especificidade da interação lectina-carboidrato e a sensibilidade dos ensaios quimiluminescentes. AK, KA, CBC e CEC apresentaram menor expressão de α -D-glucose/manose e resíduos de α -L-fucose, em comparação com o tecido normal. Os tumores cutâneos apresentaram maior expressão de resíduos de β -Gal-(1-3)-GalNAc que o tecido normal. AK e SCC exibiram maior expressão de resíduos Neu5Ac- α (2,3)Gal que a epiderme normal. KA e BCC apresentaram valores de URL equivalentes, em comparação com o tecido normal. A partir dos resultados descritos acima podemos concluir que existiu uma correlação linear entre a quantidade de lectina e a quimiluminescência após a sua ligação covalente ao éster de acridina. Todas as lectinas reconheceram especificamente os carboidratos contidos nos discos de polissacarídeos, e a sua ligação seguiu o fenômeno da Isoterma de Langmuir, a partir do qual a quantidade máxima de açúcar presente na membrana estava disponível para interagir com a lectina. Mais estudos são necessários para calcular as constantes de associação e dissociação através do método quimiluminescente. Estes resultados comprovam a importância das lectinas como potenciais biomarcadores para detecção de alterações no glicofenótipo de neoplasias e ajudam a compreender o processo de interação dessas proteínas com os seus ligantes, os carboidratos.

ANEXO 1

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE LACTULOSE POR β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS COM PANI

Atualmente já é bem estabelecido que a ingestão de certos alimentos pode melhorar o estado de saúde e pode prevenir algumas doenças, tais como câncer. Neste contexto, é possível compreender da perspectiva médica e comercial, a importância dos alimentos funcionais, os quais são definidos como alimento, processado ou natural, que contém compostos biologicamente ativos conhecidos. Estes alimentos fornecem benefícios à saúde clinicamente comprovados e, portanto, são importante na prevenção, gestão e tratamento de doenças crônicas (MARTIROSYAN, 2011).

Prebiótico é um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon e, portanto, melhora a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Para que um componente alimentar seja considerado um prebiótico, ele deve obedecer os seguintes: ser resistente a acidez gástrica; ser fermentado pela microbiota intestinal; estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de bactérias intestinais associadas com a saúde e o bem-estar (VRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

Portanto, os prebióticos melhoram o equilíbrio da microbiota intestinal, aumentando o crescimento de bifidobactérias e/ou inibindo o crescimento de bactérias nocivas. Neste processo eles são metabolizados a ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, propiônico e butírico), ácido lático e a metano, hidrogênio e dióxido de carbono (VRESE; SCHREZENMEIR, 2008). A

produção desses metabólitos resulta em imunoestimulação. Imunoestimulação aumenta a bioregulação, como por exemplo, estresse apetite e absorção; aumenta imunidade e supressão de alergias; atua na prevenção de doenças, incluindo diarreia, constipação, câncer, colesterolemia, hipertensão e diabetes; e atua na supressão do envelhecimento, bem como, na inibição da mutagênese, carcinogênese, processos de oxidação e putrefação intestinal (MITSUOKA, 2014).

Esses ingredientes apresentam funções tecnológicas importantes. Eles são utilizados como aditivo alimentar, atuam na manutenção da saúde intestinal, na prevenção da constipação e da colite, como agentes anticancer e imunopotencializador, na remoção do colesterol, redução de doença cardiovascular e prevenção da obesidade, na restauração da microbiota vaginal, na produção de bacteriocinas, na alimentação de aves, peixes, porco e gado (PATEL; GOYAL, 2012).

Existe uma ampla variedade de prebióticos com várias propriedades e origem químicas. Os principais tipos são: inulina, frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), isomaltoligossacarídeos (IMO), xilooligossacarídeos (XOS), arabinoxilooligossacarídeos (AXOS), polidextrose, lactilol, manitol, maltodextrina, raffinose, sorbitol, lactosucrose e lactulose (BARTOLOMEO; STARTEK; ENDE, 2012).

Lactulose (4- α -D-galactopiranosil-D-frutofuranose) é um dissacarídeo sintético composto de duas moléculas, frutose e galactose, ligadas por ligação glicosídica β -1,4. Esta ligação não é hidrolisada por enzimas digestivas de mamíferos, portanto a lactulose passa pelo estômago e pelo intestino delgado sem ser degradada. É utilizada por todas as espécies de *Bifidobacterium*

(*Bifidobacteria bifidum*, *Bifidobacteria longum*, *Bifidobacteria infantilis*, *Bifidobacteria adolescentis*) e *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, etc), as quais residem no trato intestinal humano, estimulando o crescimento das mesmas e inibindo a proliferação de bactérias patogênicas, tais como *Salmonella*. No colon, estas bactérias metabolizam a lactulose e produzem dióxido de carbono, ácido láctico, acético e fórmico (PANESAR et al., 2009). Estes ácidos aumentam a motilidade intestinal e a secreção fluida dentro do intestino, causando um efeito laxativo para o indivíduo.

Devido aos seus benefícios à saúde, a lactulose tem sido utilizada em tratamentos clínicos, processamento de alimentos e na indústria alimentícia. O uso comercial mais importante da lactulose é na indústria farmacêutica, na qual é utilizada como droga efetiva contra constipação crônica e encefalopatia hepática. No processamento de alimentos, lactulose é utilizada como ingrediente funcional ou fator bifidus. Lactulose foi aprovada como ingrediente alimentar pela Comissão Europeia (2011), autoridade reguladora da Qualidade e Segurança de Alimentação e Alimentos para Europa (WANG et al., 2013). Além de possuir ação prebiótica, lactulose possui outros efeitos, tais como, aumento da absorção de minerais, efeito hipocolesterolêmico, sobre os ossos e sobre a redução da glicose sanguínea, redução no índice litogênico, prevenção ou redução da infecção do trato urinário, redução no tempo de trânsito intestinal e preparo intestinal (SEKI. SAITO, 2012).

Lactulose pode ser produzida por isomerização da lactose, reagrupando o resíduo de glicose para formar uma molécula de frutose. Alcalies e enzimas são utilizados como catalisadores desta reação. Métodos sistemáticos de

utilização de um catalisador, para a produção de lactulose, pode ser dividido em dois grupos principais, métodos químico e enzimático (PANESAR; KUMARI, 2011).

A produção industrial de lactulose é exclusivamente realizada por isomerização química da lactose via rearranjo de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein (LA). O processo inclui expansivos passos de separação e purificação para remover os subprodutos. A reação pode ser catalisada pelo uso de alcalies, tais como, hidróxido de sódio, óxido de magnésio e aminas terciárias, pelo uso de sulfitos, fosfatos, ácido bórico com trietilamina, aluminato de sódio e carbonato de sódio, em altas temperaturas. Além disso, resinas de troca aniônica têm sido utilizadas para isomerização da lactose em lactulose, utilizando íons hidroxila. Estas resinas também são utilizadas para purificação do produto final (AIDER; de HALLEUX, 2007; PANESAR; KUMARI, 2011).

A síntese enzimática de oligossacarídeos tem ampliado o potencial biotecnológico dos mesmos, e representam uma alternativa devido à alta especificidade destas proteínas em relação aos seus substratos. Dentre as reações enzimáticas utilizadas na obtenção de oligossacarídeos tem se destacado as reações de hidrólise, transglicosilação e isomerização (GIESE et al., 2011; MURATA; USUI, 2006).

Um dos mais importantes isômeros da lactulose é a 1-lactulose (1- α -D-galactopiranosil-D-frutose) e foi identificado pela primeira vez por Ajisaka et al. (1987). Resultados de testes clínicos mostraram que 1-lactulose tem função biológica benéfica para a saúde e pode ser classificada como prebiótico (FÖRSTER-FROMME et al., 2011).

Lactulose disponível comercialmente é produzida atualmente, principalmente, através de isomerização química da lactose em meio alcalino. Entretanto, a remoção de catalisadores e subprodutos, e a consequente necessidade de energia são as principais desvantagens de um processo químico. Na última década, particular atenção tem sido dedicada ao uso de glicosil hidrolase e celobiose 2-epimerase como biocatalisadores para produção de lactulose.

Glicosil hidrolases (GH, EC 3.2.1.X) são enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre carboidratos e resíduos não-carboidrato. GH têm sido classificadas em mais de oitenta famílias de acordo com a sua homologia de sequência de aminoácidos e semelhanças estruturais. Dentre estas enzimas, apenas β -glicosidase e β -galactosidase têm sido utilizadas para produção de lactulose (WANG et al., 2013)

Vaheri e Kaupinnen (1978) relataram a bioconversão enzimática da lactose em lactulose, na presença de frutose, utilizando β -galactosidase a partir de *Saccharomyces fragilis* DSM 70344. Desde então, uma série de estudos sobre a síntese enzimática de lactulose têm sido realizados (MAYER et al., 2004; LEE; KIM; OH, 2004; KIM; OH, 2012; SITANGGANG; DREWS; KRAUME, 2014, 2015; RENTSCHLER et al., 2015).

A síntese enzimática de lactulose utilizando a β -galactosidase se dá a partir da hidrólise da lactose a monossacarídeos glicose e galactose, e transferência do resíduo galactosil para a frutose seguida pela formação de lactulose via um mecanismo rápido de transgalactosilação. A lactulose resultante a partir deste método é um prebiótico “limpo” e seguro (WANG et al., 2013).

β -D-galactosidase (β -D-galactosidase galactohidrolase, E.C. 3.2.1.23), mais conhecida como lactase é uma das enzimas mais importante utilizadas no processamento de alimentos. Ela catalisa a hidrólise de resíduos β -D-galactose pela extremidade não-redutora em β -D-galactosídeos. Convencionalmente, sua principal aplicação é a hidrólise da lactose do leite e seus derivados (PEREIRA-RODRIGUEZ et al., 2012).

Muitos organismos sintetizam naturalmente a β -D-galactosidase, incluindo animais, plantas e microorganismos. Entretanto, a fácil manipulação e melhores rendimentos dos microorganismos têm favorecido seu estabelecimento como principal fonte para produção industrial de β -D-galactosidases. Embora as bactérias possam oferecer mais versatilidade os elementos GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros), tais como, as leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*, e os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* ainda são considerados as fontes viáveis para produção industrial dessa enzima para indústria farmacêutica e de biotecnologia (RUBIO-TEXEIRA, 2006).

β -galactosidase de *K. lactis* é uma enzima tetramérica, composta por quatro subunidades idênticas, com faixa de pH de máxima atividade entre e pH 6,6 – 7,0. Entretanto, alguns estudos reportaram a presença de duas formas ativas em gel de eletroforese de amostras purificadas da levedura, a qual foi atribuída a presença de dímeros e tetrâmeros. Consequentemente, concluiu-se que o padrão de oligomerização observada corresponde a “dimerização dos dímeros” (BECERRA et al., 1998; ZHOU; CHEN, 2001). Dois íons Na^+ e um íon Mg^{2+} estão localizados no sítio ativo da enzima, perto do anel de galactose (PEREIRA-RODRIGUEZ et al., 2012).

β -galactosidase tem sido imobilizada em diferentes suportes, tais como partículas magnéticas da rede semi-interpenetrada de polisiloxano-polivil álcool (POS-PVA) (NERI et al., 2008, 2009a), partículas de poli(glicidilmetacrilato e metilmetacrilato) (BAYRAMOGLU; TUNALI; ARICA, 2007), partículas magnéticas de polisiloxano-polianilina (mPOS-PANI) (NERI et al., 2009b), membrana de matriz mista contendo dióxido de zircônio (JOCHEMS et al., 2011), suportes acrílicos epoxi ativados (TORRES; BATISTA-VIEIRA, 2012), nanoesferas de polietilenoimina magnéticas (LIU et al., 2012), membranas de acetato de celulose (GÜLEÇ, 2013), hidrogéis enxertado com quitosana (FACIN et al., 2015).

O uso de enzimas como biocatalisadores é limitado devido à falta de estabilidade e susceptibilidade a desnaturação das mesmas (HOMAEI et al., 2013). Para resolver este problema as enzimas têm sido imobilizadas em diferentes tipos de suporte.

A imobilização pode ser definida como uma técnica de fixação de biocatalisadores (enzimas, microrganismos e organelas) sobre ou dentro de suportes sólidos, resultando em sistemas heterogêneos (ARICA et al., 2008).

Esta técnica tem sido uma ferramenta biotecnológica muito importante, pois proporciona a reutilização das enzimas, obtenção de produtos isentos de contaminação, maior estabilidade ao pH e à temperatura, redução dos efeitos de inibição pelo substrato e os produtos são removidos continuamente do biorreator, além de facilitar a interrupção da reação e separação dos produtos da catálise heterogênea. Todas estas vantagens acarretam uma economia significativa no custo global do processo, desde que o procedimento de imobilização não seja muito dispendioso, que haja boa recuperação da

atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (CASTRO et al., 2008).

Durante o uso das enzimas imobilizadas, efeitos de transferência de massa podem ocasionar gradientes adversos de substratos ou de pH que podem reduzir a velocidade de reação e o rendimento do produto. A perda de atividade biocatalítica durante a imobilização deve ser reduzida para compensar o custo extra do processo (SHANMUGAM; SATHISHKUMAR, 2009).

Esta técnica começou a ser estudada no início do século passado, quando Nelson e Griffin (1916) observaram que o carvão ativo, ao qual havia sido adicionada uma preparação biológica com atividade invertásica, mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavado. Pesquisadores alemães, em 1954, retomaram os estudos e demonstraram que polímeros sintéticos, resina diazotadas de poliaminoestireno, poderiam ser usados para imobilizar proteínas com atividade biológica (CASTRO et al., 2008).

A partir de 1960, houve um aumento significativo no número de publicações sobre imobilização de enzimas, tendo em vista as potenciais vantagens econômicas e operacionais que o processo oferece para a biotecnologia. Até meados da mesma década, a maior parte dos trabalhos com enzimas imobilizadas era realizada por pesquisadores de áreas básicas, que perceberam que estes sistemas poderiam ser utilizados como catalisadores industriais altamente específicos e eficientes. Neste mesmo período, passou-se também a buscar suportes com boa resistência química e mecânica, de modo a prolongar o uso do biocatalisador. Diferentes métodos de imobilização foram estudados e observou-se que as propriedades catalíticas de uma mesma

enzima poderiam ser alteradas em função do método de imobilização utilizado e do suporte empregado. E finalmente tiveram início os estudos da aplicação de enzimas imobilizadas em biorreatores contínuos (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

Existem dois principais métodos de imobilização de biomoléculas: a imobilização no interior de um suporte, por interações físicas (encapsulação e retenção por meio de membranas) e a imobilização na superfície de um suporte através de interações químicas (ligação covalente, forças de van der Waals, ligação iônica) (HOMAEI et al., 2013).

A imobilização de enzimas no interior de um suporte está fundamentada na diferença de tamanho entre as moléculas do catalisador e do soluto. Dois métodos podem ser adotados: a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, ou a retenção do biocatalisador por uma membrana porosa. Em ambas as metodologias, a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não há ligações físicas ou químicas envolvidas entre a enzima e o suporte. Este método inclui a encapsulação em gel e em fibras e a microencapsulação (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

A enzima pode ser permanentemente fixada na superfície de um suporte por meio de interações como a adsorção física, ligação iônica, ligações covalentes e ligação a um metal (quelação). O método de imobilização por adsorção física, cujo princípio é a atração da enzima pela superfície do suporte por meio de forças de van der Waals (interações fracas), é a técnica mais antiga de produção de enzimas imobilizadas. Consiste no contato da solução de enzima em água com o suporte, em determinadas condições de pH,

temperatura e agitação. Este tipo de imobilização pode ser benéfico por causar baixas modificações na estrutura nativa da enzima, porém, durante a sua utilização ocorre a dessorção da mesma do suporte (ZANIN; MORAES, 2004; LIGLER; TAITT, 2011).

A imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte que contém íons residuais. A principal diferença entre adsorção física e a ligação iônica é a energia de ligação envolvida entre a enzima e o suporte, uma vez que as interações íon- íon são mais fortes que as forças de van der Waals, porém mais fracas que a ligação covalente. A grande vantagem deste tipo de imobilização é a obtenção de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas devido ao caráter iônico da ligação e as condições amenas de imobilização. Entretanto, pode ocorrer a liberação da enzima pelo suporte, o que contamina o produto final e reduz a atividade específica do biocatalisador (CASTRO et al., 2008).

A imobilização por ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação forte entre a enzima e o suporte. As proteínas, geralmente, se ligam aos grupos funcionais disponíveis na superfície do suporte, como -COOH, -OH e o -NH₂. Este método é o mais difundido e estudado, porém é o mais complexo, pois utiliza condições menos brandas que os demais. Como a ligação formada é forte, a enzima imobilizada é estável a altas temperaturas, a solventes orgânicos e a condições extremas de pH. No entanto, essas ligações covalentes podem perturbar a estrutura tridimensional da enzima nativa diminuindo, deste modo, a atividade enzimática da mesma (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

A imobilização de proteínas tem sido uma ferramenta biotecnológica muito importante, pois proporciona a reutilização das enzimas, obtenção de produtos isentos de contaminação, maior estabilidade ao pH e à temperatura, redução dos efeitos de inibição pelo substrato e os produtos são removidos continuamente do biorreator, além de facilitar a interrupção da reação e separação dos produtos da catálise heterogênea. Todas estas vantagens acarretam uma economia significativa no custo global do processo, desde que o procedimento de imobilização não seja muito dispendioso, que haja boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (HOMAEI et al., 2013).

As recentes tecnologias para a imobilização de enzimas requerem materiais com propriedades especiais, as quais aliadas à melhoria na estratégia do processo de imobilização configuram fatores essenciais para o sucesso da imobilização. Para ser efetivo na imobilização, o suporte deve deixar a enzima acessível ao substrato, manter sua atividade por longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (SHELDON, 2007).

Entre os suportes utilizados para imobilização de enzimas, os que possuem propriedade magnética têm sido utilizados, dentro da escala nanométrica à micrométrica, em diversas aplicações biomédicas devido a não toxicidade (ITO et al., 2005; TOKORO et al., 2009). Apesar de as partículas magnéticas apresentarem alta sensibilidade magnética, em fase aquosa elas exibem pequena estabilidade coloidal. Portanto, modificações na superfície dessas partículas têm sido realizadas para impedir a agregação das mesmas em solução (SAWANT et al., 2009). Nanopartículas de óxido de ferro têm sido

revestidas com surfactantes ou polímeros (BERRY et al., 2003). Isso permite que elas sejam dispersas dentro de fluídos homogêneos melhorando a sua estabilidade e biocompatibilidade, tornando a biomolécula imobilizada mais estável (MACIEL, 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDER, M.; de HALLEUX, D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 18, p. 356 – 364, 2007.
- AJISAKA, K.; NISHIDA, H.; FUJIMOTO, H. Use of an activated carbon column for the synthesis of disaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of β -galactosidase. **Biotechnol. Lett.**, v. 9, p. 387 – 392, 1987.
- ARICA, M. Y.; ALTINTAS, B.; BAYRAMOĞLU, G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 665-669, 2008.
- BAYRAMOGLU, G.; TUNALI, Y.; ARICA, M. Y. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMAeMMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. **Catal. Commun.**, v. 8, p. 1094 – 1101, 2007.
- BECERRA, M. New secretory strategies for *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **Protein Eng.**, v. 14, p. 379 – 386, 2001.
- BERRY, C. C. et al. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticle: influence on fibroblasts in vitro. **Biomaterials.**, v. 24, p. 4551 – 4557, 2003.
- CASTRO, H.F. et al. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E.P.S., FERRARA, M.A., CORVO, M.L. **Enzima em biotecnologia:**

- produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 488p.
- EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 99, p. 2065 – 2082, 2015.
- FACIN, B. R. et al. Immobilization and controlled release of β -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chem.**, v. 179, p. 44 – 51, 2015.
- FÖRSTER-FROMME, K et al. A new enzymatically produced 1-lactulose: a pilot study to test the bifidogenic effects. **Int. Dairy J.**, v. 21, p. 940 – 948, 2011.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1401 – 1412, 1995.
- GIESE, E. C. et al. Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina.** v. 32, p. 683 – 700, 2011.
- GUERRERO, C. et al. Repeated-batch operation for the synthesis of lactulose with β -galactosidase immobilized by aggregation and crosslinking. **Bioresour Technol.**, v. 190, p. 122 – 131, 2015.
- GÜLEÇ, H. A. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: effect of surface characteristics. **Colloids Surf. B Biointerfaces.**, v. 104, p. 83 -90, 2013.
- HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: an update. **J. Chem. Biol.**, v. 6, p. 185 – 205, 2013.
- ITO, A. et al. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 100, p. 1 – 11, 2005.

- JOCHEMS, P. et al. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 49, p. 580 – 588, 2011.
- KIM, Y.; OH, D. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresour. Technol.**, v. 104, p. 668 – 672, 2012.
- LEE, Y.J.; KIM, C. S.; OH, D. K. Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 787 – 793, 2004.
- LIGLER, F. S.; TAITT, C. R. Optical biosensors: today and tomorrow. Elsevier p.151, 2011.
- LIU, J. F. et al. Reversible immobilization of *K. fragilis* β -galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v. 82, p. 64 – 70, 2012.
- MACIEL, J. C. Compósitos de partículas magnéticas e polímeros para imobilização de tripsina [tese de doutorado]. Recife: Centro de Ciências Biológicas da UFPE; 2012.
- MARTIROSYAN, D. M. Functional Foods and Chronic Diseases: Science and Practice. Food Science Publisher: Richardson, TX, 2011.
- MAYER, J. et al. Enzymatic production and complete nuclear magnetic resonance assignment of the sugar lactulose. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6983 – 6990, 2004.
- MITSUOKA, T. Development of Functional Foods. **Biosci. Microbiota Food. Health**, v. 33, p. 117 – 128, 2014.

- MURATA, T.; USUI, T. Enzymatic synthesis of important oligosaccharide units involved in N-and O-linked glycans. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**, v. 12, p. 161 – 174, 2006.
- NERI, D. F. M. et al. Immobilization of b-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. **Catal. Commun.**, v. 9, p. 2334 – 2339, 2008.
- NERI, D. F. M. et al. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* b-galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chem.**, v. 115, p. 92 – 99, 2009(a).
- NERI, D. F. M. et al. Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane polyaniline particles. **React. Funct. Polym.**, v. 69, p. 246 – 251, 2009(b).
- PANESAR, P. S. Synbiotics: potential dietary supplements in functional foods. UK: FST Bulletin, Food Science Central, IFIS Publishing; 2009.
- PANESAR, P. S.; KUMARI, S. Lactulose: Production, purification and potential applications. **Biotechnol. Adv.**, v. 29, p. 940 – 948, 2011.
- PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **Biotech.**, v. 2, p. 115 – 125, 2012.
- PEREIRA-RODRÍGUEZ, A. et al. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **J. Struct. Biol.**, v. 177, p. 392-401, 2012.

- RENTSCHLER, E. et al.
Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. *J. Dairy Sci.*, v. 98, p. 6767 – 6775, 2015.
- RUBIO-TEXEIRA, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, p. 212 – 225, 2006.
- SAWANT, R. M. et al. Nanosized cancer cell-targeted polymeric immunomicelles loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **J. Nanopart. Res.**, v. 11, p. 1777 –1785, 2009.
- SEKI, N.; SAITO, H. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. **Int. Dairy J.**, v. 22, p. 110 – 115, 2012.
- SHANMUGAM, S.; SATHISHKUMAR, T. Enzyme technology. I. K. Int Pvt Ltd, p 110, 2009.
- SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Adv. Synth. Catal.**, v. 349, p. 1289 – 1307, 2007.
- SITANGGANG, A. B.; DREWS, A.; KRAUME, M.
Continuous synthesis of lactulose in an enzymatic membrane reactor reduces lactulose secondary hydrolysis. **Bioresour. Technol.**, v. 167, p. 108 – 115, 2014.
- TOKORO, H. et al. Magnetic iron particles with high magnetization useful for immunoassay. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 321, p. 1676 – 1678, 2009.
- TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus circulans* onto epoxy-activated acrylic supports. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v. 74, p. 230 – 235, 2012.

- VAHERI, M.; KAUPINNEN, V. The formation of lactulose (4-O- β -galactopyranosylfructose) by β -galactosidase. **Acta Pharm. Fenn.**, v. 87, p. 75 – 83, 1978.
- VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. **Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.**, v. 111, p. 1 – 66, 2008.
- WANG, H. et al. Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 6167 – 6180, 2013.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p.
- ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochem. Eng. J.**, v. 9, p. 33 – 40, 2001.

**Artigo a ser submetido ao periódico Applied Biochemistry and
Biotechnology**

Fator de Impacto: 1,735

Qualis Capes: B2

**MAGNETIC NANOPARTICLES COATED WITH POLYANILINE TO β -
GALACTOSIDASE IMMOBILIZATION AND LACTULOSE PRODUCTION**

Luiza Rayanna Amorim de Lima¹, Sara Isabel Silvério², Lígia Rodrigues², Luiz
Bezerra de Carvalho Júnior¹, José António Teixeira²

¹Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami,
Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50030 Recife, PE,
Brazil

²Instituto para Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica,
Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

Abstract

β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* was immobilized on magnetic nanoparticles coated with polyaniline (mPANI) by covalent bond. The levels of the significant parameters and the interaction effects between various factors which could influence the immobilization process were analysed using experimental design and immobilized enzyme derived (IED) was characterized. To improve lactulose synthesis using immobilized β -galactosidase, the optimal reaction conditions, such as lactose and fructose concentrations and pH were determined. The retention of specific activity (3.5 U.mg^{-1}) was achieved in the optimum conditions of immobilization, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ amount of enzyme, 10.2 h of incubation in pH 8.0 at 4°C . There were changes in optimum temperature and pH profile of native and immobilized enzyme. The K_m for both native and immobilized enzyme were found to be not significantly different. Immobilized β -galactosidase presented a higher operational and thermal stability than the soluble enzyme. Lactulose synthesis was improved after optimization of the reaction conditions. When the lactulose production was carried out at 40°C using lactose and fructose 200 g.L^{-1} in 50 mM potassium phosphate buffer, the lactulose concentration was 2.1 g.L^{-1} . Hence, one can conclude that mPANI is an attractive and efficient support for β -galactosidase immobilization and lactulose synthesis.

1. Introduction

The recent technologies for the immobilization of enzymes require materials with special properties, such as high porosity, high mechanical strength, thermal and chemical stability, and possess large surface area. Within this scope, the

magnetic nanoparticles has become an important kind of material used in different applications, for example, imaging agents in magnetic resonance imaging, magnetic drug targeting, hyperthermia. These particles have been used to immobilize enzymes in order to enhance bioelement stability, ease separation from the reaction mixture, and increase catalyst stability [1].

The processing new materials with magnetic behavior or magnetic particles containing a conductive polymers or surfactants it's required to produce a material biocompatible and more stable [2]. Polyaniline (PANI) receives a special attetion among other conducting polymers due to the simple synthetic methodology, good environmental stability, optical activity, controllable doping, easy tunability of their electronic properties and high levels of electromagnetic shielding performances at microwave frequencies with a low mass by unit of surface [3, 4].

The enzymes immobilization became one of the most innovative and recently well-studied systems to carry out a production on industrial scale with higher productivity. It is allows us to overcome most of the process restrictions, improve recovery of biocatalysts for reuse, offer better stability, activity, and selectivity of the molecules, higher resistance against inhibition, help the elimination of unnecessary separation and purification steps, and consequently produce desired products with more efficiency [5].

The enzymatic synthesis expanded the biotechnological potential of prebiotics due to the high specificity of these proteins to their substrates. Among the enzymatic reactions used to obtain prebiotics stands out the hydrolysis reactions, transglycosylation and isomerization using glycosyltransferases and glycosidases, such as β -galactosidase [6]. This enzyme works as biocatalyst in

transglycosylation reactions to produce lactulose from one molecule of fructose and one molecule of galactose via β -1,4-glycosidic bond [7]. Lactulose (4-O- β -galactopyranosyl-D-fructose) is reported to have a number of physiological effects on humans, such as enhancing colonic motility, enriching the growth of probiotic bacteria, improving mineral absorptions, reducing the growth of putrefactive bacteria, acting as laxative agent in the treatment of constipation and of liver diseases [8].

In the present study, the lactulose synthesis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* covalently immobilized on magnetic nanoparticles coated with PANI is presented.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of iron oxide nanoparticles

The iron oxide nanoparticles were synthesized according to Maciel et al., (2012) by co-precipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} . Solutions of 1.1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mL) and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,6 M (5 mL), simultaneously, to 50 mL distilled water under magnetic agitation. Then 5.0 M NaOH was added dropwise up to pH 10 when black particles were produced. The mixture was heated to 80 °C for 30 min with vigorous stirring. The magnetic nanoparticles were washed with distilled water until pH was neutral. The material was dried up at 50 °C, smashed and sifted (<370 nm).

2.2. Coating with PANI

Oxidative polymerization of aniline was carried out in the presence of magnetic nanoparticles (0.5 g) by treating them with 0.1 M KMnO_4 (50 mL) solution at 25 °C for 1h and washed with distilled water. The magnetic- KMnO_4 nanoparticles were incubated into 50 mL of 0.5 M aniline solution (in 1.0 M HCl). The polymerization occurred at 4 °C for 1h and after that, the magnetic nanoparticles coated with polyaniline (mPANI) were successively washed with distilled water, 0.1 M citric acid and rewashed with distilled water. The material was dried up at 50 °C and kept at 25 °C.

2.3. Magnetic nanoparticles transmission electron microscopy (TEM)

The morphology and particle size of the nanoparticles were characterized using FEI TECNAI SPIRIT 80 transmission electron microscope.

2.4. Determination of enzymatic activity and protein determination

Activity of both soluble and immobilized enzyme was determined using *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG). The amount of *o*-nitrophenol (ONP) released during the reaction was measured using microplate reader at 415 nm. One β -galactosidase unit (U) was defined as the amount of enzyme which liberated 1.0 μmol of ONP per min at pH 7.0, at 37 °C. Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard protein. The covalently attached protein on support was determined by difference between the amount of offered protein for immobilization and the protein contained in the supernatant and the washing buffers.

2.5. β -galactosidase immobilization

For activation of mPANI, 10 mg of nanoparticles were incubated in 2.5% (v/v) glutaraldehyde (100 μ L) in 900 μ L of 0.1 M H_2SO_4 under orbital stirring for 2h at 25 °C. Thereafter, the particles were washed with distilled water five times and then with 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. The immobilized enzyme derived (IED) was separate from the reaction medium by magnetic field (Ciba corning; 0.6 T). The levels of the significant parameters and the interaction effects between various factors (amount of enzyme, pH, immobilization time and temperature), which could influence the immobilization process, were analysed using experimental design. In this study, the experimental plan consisted of trials and the independent variables were studied at three different levels and one dependente variable (Y), specific activity. The variables and their levels selected for obtaining immobilization of β -galactosidase onto mPANI were: amount of enzyme (50, 275 and 500 μ g), pH (6.0, 7.0 and 8.0), immobilization time (2, 10 and 18 h) and temperature (4, 20.5 and 37 °C).

Statistical analysis of the model was performed to evaluate the analysis of variance (ANOVA) which included lack of fit, Fisher's F-test, its associated probability p(F) and correlation coefficient R to measures the goodness of quadratic model. For the present study, a total of 20 tests were performed to estimate the coefficients. The generated mathematical model was validated by conducting experiment at given optimal conditions.

2.6. IED characterization

2.6.1. Optimum pH

Activity of both soluble and immobilized enzyme was assayed using different buffer solutions: 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.0), 50 mM potassium phosphate buffer, (pH 6.0, 7.0 and 8.0), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5 and 7.5), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) and 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.5, 10.0 and 10.5).

2.6.2. Optimum temperature and Thermal Stability

Activity of soluble enzyme and IED was carried out in different temperatures (25 a 80 °C) using 50 mM glycine-NaOH pH 9.5. Thermal stability of soluble and immobilized enzyme derivative was studied by incubating both enzymatic forms from 30 to 90 °C for 30 min. After 30 min at 25 °C, the enzyme activity was determined under standard conditions.

2.6.3. Operational Stability

The immobilized derived reusability was assessed after performing ten cycles of the same sample activity using 1.0 mM ONPG as substrate. After each cycle, the derivative was washed three times with 0.05 mM KPB pH 8.0 buffer and the procedure was repeated 30 minutes later with other substrate aliquots.

2.6.4. Kinetics analysis

The apparent Michaelis-Menten constant (K_m^{app}) and maximum velocity ($V_{m\acute{a}x}$) for ONPG hydrolysis were assayed by determining the enzyme activity in increasing concentrations substrate (0.1 – 5.0 mM). The calculation of the constants was performed using the OriginPro 8 software (OriginLab

Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA USA 01060). Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d.).

2.7. Lactulose production

The production of lactulose in the presence of lactose and fructose by β - galactosidase (both soluble and immobilized) was performed in 50 mM KPB pH 8.0 buffer and 50 mM Glycine- NaOH pH 9.5 at 40 ° C for 5h (with 30 min intervals). To investigate the influence of donor and receptor amount, the initials concentrations of lactose and fructose tested were 100 e 200 g.L⁻¹, varying the mixing ratio in the reaction medium. After that, aliquots of 100 μ L were withdrawn, heated at 100 °C for 10 min and filtered through filters with pores of 0.2 mm to remove any interference caused by the nanoparticles that were not separated by applying the magnetic field. Lactose, galactose, glucose, fructose and lactulose concentration were determined by HPLC (Jasco AS-2057 Plus), using column Prevail Carbohydrate ES (5 μ m, 250 x 4.6 mm) (Alltech) and evaporative light scattering detector Sedex 85 (Sedere); used mobile phase was acetonitrile and water solution (70:30, v/v) at a flow rate of 0.9 mL.min⁻¹ (Jasco PU-2080 Plus).

3. Results and Discussion

The morphology, shape and size distribution of magnetic nanoparticles and mPANI were analyzed by electron micrographs observation (Figure 1). Some magnetic nanoparticles are partially superimposed onto the agglomerate core, i.e., the boundary limit of each nanoparticle is partially diffuse; thus a precise average particle size cannot be determined. The presence of theses

agglomerates may be due also to the magnetic nanoparticles aggregated together to reduce their surface energy [9] and/or due to the magnetic dipole-dipole interactions and the van der Waals forces between the nanoparticles [10, 11]. In the present study, the magnetic nanoparticles and mPANI exhibited agglomerates with apparently regular morphology, nearly spherical/ellipsoidal shape, dimensions around 14.5 ± 4.4 nm (magnetic nanoparticles) and 15.6 ± 6.16 nm (mPANI), and narrow particle size distribution.

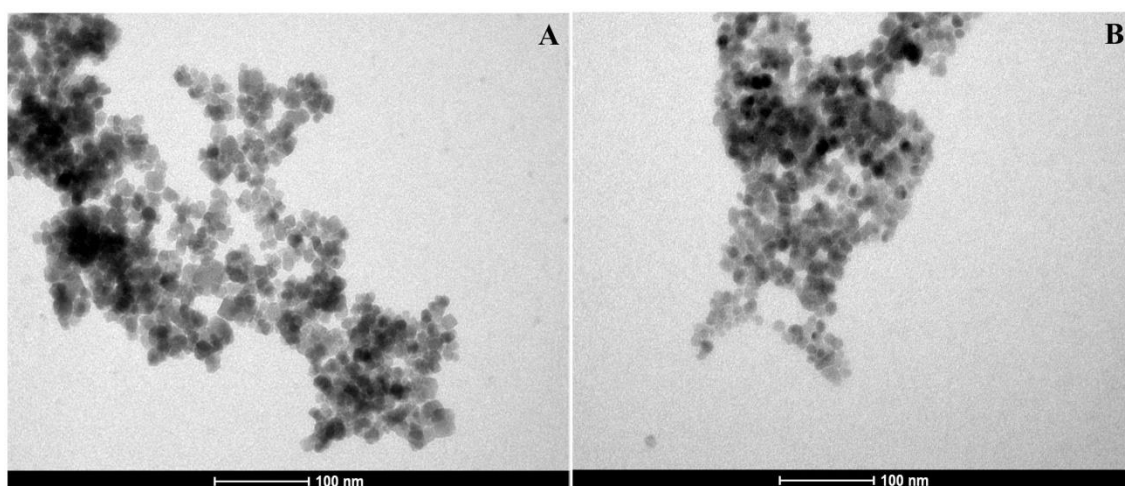


Figure 1. TEM images of magnetic nanoparticles (**A**) and mPANI (**B**).

The immobilization process changes the physical and chemical characteristics of enzymes. This is due to following factors: diffusions effects or mass transfer limitations, originated from the diffusion resistance of the substrate to the catalytic site of the enzyme; protein conformational effects due to changes in the tertiary structure of the active site; microenvironment effects resulting from the immobilization process and support characteristics. Specific activity of IED is an essential parameter to evaluation of immobilization,

therefore it was used as response during analysis of the significant parameters and the interaction effects between various factors which could influence the process.

The experimental design and results obtained from the experiments are presented in table 1. Among the conditions, the major retention of specific activity on support was 3.63 U.mg^{-1} . ANOVA, presented in table 2, indicated that the model was statistically significant and adequate to represent the current relationship between the independent variables (factors) and the dependent variable (specific activity), which was confirmed by F values (Table 2). The value R^2 (0.9) indicates that that 90 % of the variability in the response can be explained using this analysis. Only one variable presented statistical significance, immobilization temperature. The interaction between the factors showed no statistically significant according to p value.

Table 1. Experimental plan and results obtained in experiments of immobilization.

Run	[b-galactosidase] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	pH	Temperature	Time	Specific Activity U.mg^{-1}
1	50	6	4°C	2 h	0
2	500	6	4°C	2 h	0.234514318
3	50	8	4°C	2 h	1.54978947
4	500	8	4°C	2 h	1.014153915
5	50	6	37°C	2 h	0
6	500	6	37°C	2 h	0.025883998
7	50	8	37°C	2 h	0
8	500	8	37°C	2 h	0.60572386
9	50	6	4°C	18 h	0
10	500	6	4°C	18 h	1.031737514
11	50	8	4°C	18 h	1.204476524
12	500	8	4°C	18 h	1.517174162
13	50	6	37°C	18 h	0
14	500	6	37°C	18 h	0
15	50	8	37°C	18 h	0

16	500	8	37°C	18 h	0
17	275	7	20.5°C	10 h	2.260016425
18	275	7	20.5°C	10 h	2.272290539
19	275	7	20.5°C	10 h	3.635550792
20	275	7	20.5°C	10 h	2.069380934

Table 2. ANOVA for experimental design.

	Freedom Degree	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	Signification F
Regression	14	19.06200164	1.361572	6.288611	0.026447633
Residue	8	2.204504968	0.275563		
Total	22	21.26650661			

Based on experiments, a mathematical model was build to obtain the maximum immobilization response within the set range of variables and following points were determined (Equation 1). Multiple regression analysis was applied to establish the polynomial coefficients and a relationship between immobilization percentage and independent variables was established by means of a quadratic polynomial equation.

$$Y = 2,55931 + 0,104683 \cdot X_1 + 0,287449 \cdot X_2 - 0,37001 \cdot X_3 + 0,020208 \cdot X_3 - 2,11034 \cdot X_4^2 - 0,05683 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,02573 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,063372 \cdot X_1 \cdot X_4 - 0,21497 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,07621 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0,09916 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (1)$$

where X_1 , amount of enzyme ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); X_2 , pH; X_3 , temperature ($^{\circ}\text{C}$); X_4 and immobilization time (h).

The calculation of the specific activity retention of the immobilized β -galactosidase was carried out using the equation shown above. In optimal conditions, IED retained $3.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ of fixed protein per g of support. The operational parameter was expressed in terms of standard dimensionless

variables (X_1 , X_2 , X_3 and X_4) with varying ranges, which are linearly related to the corresponding independent variables (amount of enzyme, pH, temperature and immobilization time), as described below:

$$X_1 = \frac{2 \cdot (C_i - C_{me})}{C_{\max} - C_{\min}} \quad (2)$$

$$X_2 = \frac{2 \cdot (pH_i - pH_{me})}{pH_{\max} - pH_{\min}} \quad (3)$$

$$X_3 = \frac{2 \cdot (T_i - T_{me})}{T_{\max} - T_{\min}} \quad (4)$$

$$X_4 = \frac{2 \cdot (t_i - t_{me})}{t_{\max} - t_{\min}} \quad (5)$$

From this analysis the optimal conditions for immobilization process of β -galactosidase onto mPANI were determined (Table 3).

Table 3. Optimal conditions of immobilization process of β -galactosidase onto mPANI calculated according to the variables X_1 , X_2 , X_3 and X_4 .

Independent Variables		Responses	
X_1	Amount of enzyme ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1	500
X_2	pH	1	8
X_3	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	-1	4
X_4	Tempo (h)	0.02524	10.20192

Marín-Navarro et al. [12] and Güleç [13] immobilized β -galactosidase from *Thermotoga maritime* and *Kluyveromyces lactis* using the concentrations 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. However, Liu et al. [14] used higher concentration of enzyme (3 mg.mL^{-1}) and different pH value (6.5) and similar time (8h).

Kishore et al. [15] used Box-Behnken design of experiment to optimize the immobilization conditions of β -galactosidase from *Cicer arietinum* seeds onto functionalized graphene nano-sheets. Mathematical model was build to obtain maximum immobilization response (84.47%), amount of support (640.06 μg), cysteamine (7.77 mM) and glutaraldehyde (3.34% v/v) concentration and amount of enzyme (896.14 μg).

β -galactosidase from *Pisum sativum* was covalently attached on Sephadex and optimal conditions, (pH 7.0 and amount of enzyme 43.8 μg) determined by experimental design [16]. Response surface methodology (RSM) was efficient to evaluate the best conditions (29 mg support, 4.3% v/v glutaraldehyde and 51.5 μg amount of enzyme) for immobilization of β -galactosidase extracted and purified from chickpea seeds on alkylamine glass [17].

The difference between the values shown in this study and the aforementioned are due to particularities, such as type support, enzyme source, type of protein binding to the support, functionalization method and particle size. The multivariate approach has several advantages, such as reducing the number of experiments and time for global analysis, better statistical interpretation and the possibility of evaluation of the interaction between the various parameters that affect the process [18].

The figure 2 shows the soluble and immobilized β -galactosidase activities in different pH and temperature values. The native enzyme and IED presented two optimum pH, 7.5 and 9.5, 8.0 and 9.5, respectively. The optimum temperatures for soluble and covalently attached β -galactosidase were found to be 25 and 40 °C, respectively.

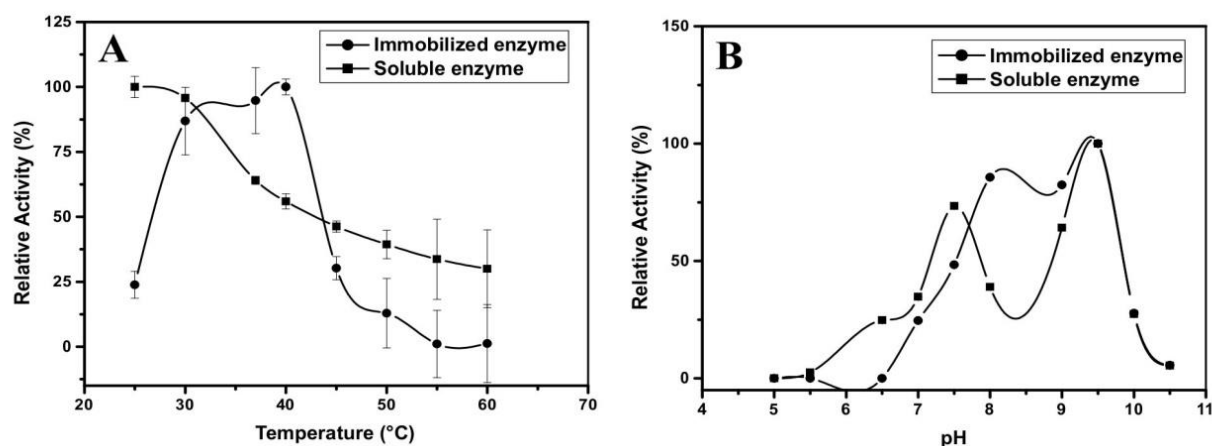


Figure 2. Temperature (A) and pH (B) effect on immobilized (●) and soluble (■) β -galactosidase activity. Enzyme activity was performed using 1 mM ONPG as substrate made in buffers with different pH values (5.0 – 10.5), and different temperatures (25 – 60 °C).

Similar results were described by Zhang, Gao, Gao, [19]. Optimum pH of immobilized and soluble β -galactosidase was 8.3 and 7.7, respectively. The authors explain that the pH change to the alkaline region is due to electric charging property support, which attracts H^+ ions of the solution to the vicinity of the material causing a decrease in the pH value. Thus, by way of compensation, the pH of the region should be high to allow the proper functioning of the enzyme.

Furthermore, the enzyme immobilization on mPANI was obtained through the formation of Schiff bases, reaction between active groups of the functionalized support with glutaraldehyde and the enzyme molecules to form the covalent bond. This reaction can change the optimum pH of the enzyme alkaline region.

Verma et al. [20] reported increase in optimum temperature and pH values of immobilized β -galactosidase from *K. lactis* (pH 7.0; 40 °C) when compared to enzyme soluble (pH 6.5; 35 °C). The same behavior was observed by Jochems et al. [21] when immobilized β -galactosidase obtained from the same source on mixed matrix containing zirconium dioxide. However, Neri et al. [22] did not reported changes between temperature and pH values of immobilized β -galactosidase onto magnetic polysiloxane - polyvinyl alcohol (mPOS-PVA) and soluble enzyme (50 °C and pH 6.5).

The immobilized β -galactosidase onto mPANI was reused repeatedly for 10 cycles at 40 °C. The IED remained stable and retained 50% of enzyme activity until the last cycle (Figure 3). Stability operational of β -galactosidase from *Kluyveromyces* sp. and *Aspergillus oryzae* immobilized on different matrix has been reported [13, 14, 20, 22, 23].

The high surface area of nanoparticles favour binding of the enzyme to the support and reaction kinetic, improving the biocatalytic efficiency for industrial applications, making the process economically viable [24].

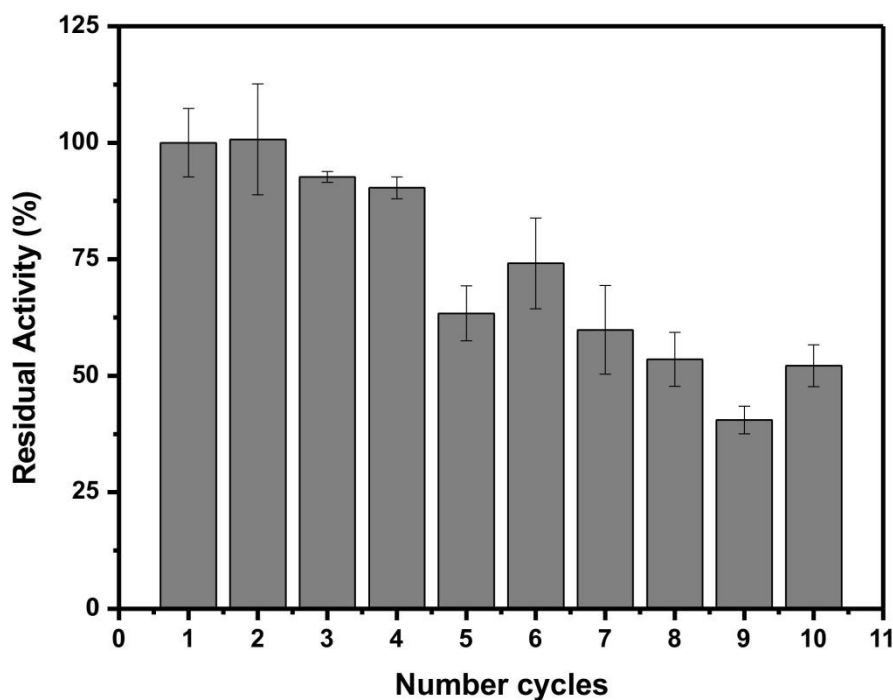


Figure 3. Operational Stability of immobilized β -galactosidase on mPANI. The activity cycles were performed using 1 mM ONPG as substrate in pH 9.5 at 40 °C.

The β -galactosidase immobilized showed higher thermal stability than soluble enzyme (Figure 4). Free enzyme lost activity after 30 min incubation at temperatures above 40 °C, and IED remained with 28% initial activity. Neri et al. [22] Elnashar and Yassin [23], Dwevedi and Kayastha [17] reported an increase in thermal stability of immobilized β -galactosidase on mPOS-PVA, carrageenan coated with thermally stable chitosan and Amberlite MB-150 beads, respectively. The increase of thermal stability of immobilized enzyme is due to the decrease in protein structure mobility promoted by enzyme anchoring to the support via covalent bonds [25].

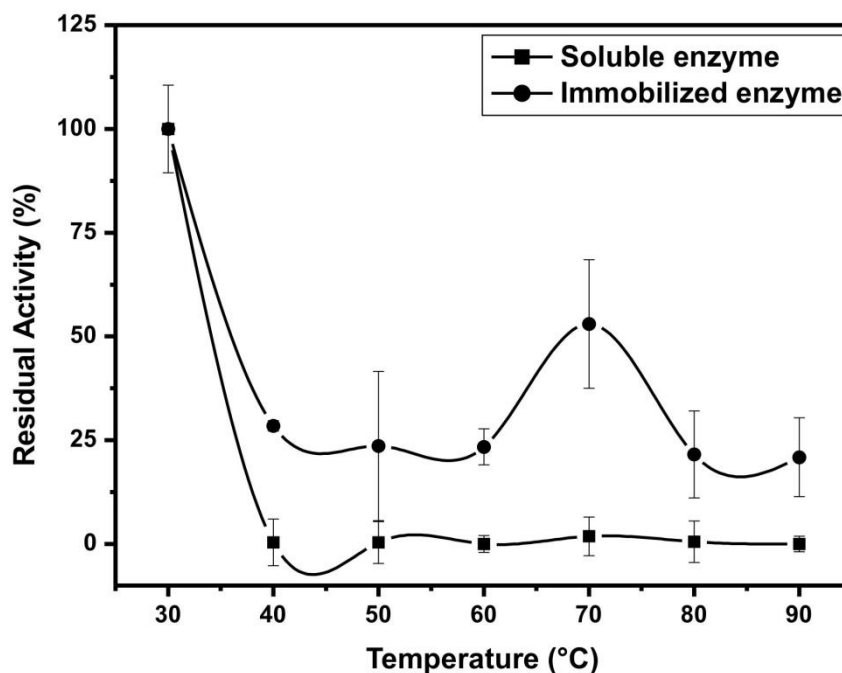


Figure 4. Thermostability study of soluble β -galactosidase (■) and immobilized (●). The free enzyme and IED were incubated at 30 - 90 °C for 30 min. After cooling, enzyme activity was determined using 1 mM ONPG as substrate in pH 9.5 at 40 °C.

K_m^{app} e $V_{m\acute{a}x}$ for native and immobilized β -galactosidase were calculated from the hyperbolic curves and estimated as 0.56 ± 0.09 mM; 0.45 ± 0.01 U.mL⁻¹ and 0.69 ± 0.21 mM; 29.94 ± 3.35 U, respectively. This difference between K_m values did not show to be statistically significant according to a *t-Student* test analysis ($p > 0.05$). This result suggests that the micro-events (partitioning, diffusional or mass transfer, conformational and steric effects) involving immobilized enzyme-substrate interaction and its microenvironment did not markedly disturb enzyme action. The fact that the enzyme immobilization on mPANI does not alter the K_m^{app} value may be considered na important advantage when compared with most of the existing supports.

K_{mapp} e $V_{m\acute{a}x}$ for native and immobilized β -galactosidase were calculated from the hyperbolic curves and estimated as 0.56 ± 0.09 mM; 0.45 ± 0.01 U.mL⁻¹ and 0.69 ± 0.21 mM; 29.94 ± 3.35 U, respectively. This difference between K_m values did not show to be statistically significant according to a t-Student test analysis ($p > 0.05$). This result suggests that the micro-events (partitioning, diffusional or mass transfer, conformational and steric effects) involving immobilized enzyme-substrate interaction and its microenvironment did not markedly disturb enzyme action. The fact that the enzyme immobilization on mPANI does not alter the K_{mapp} value may be considered an important advantage when compared with most of the existing supports.

Higher K_{mapp} values after β -galactosidase immobilization compared to those calculated for the soluble enzymes have been reported by other authors. The difference in the values of constants ranging from 1.03 to 9.46 [13 - 15, 20, 21, 23, 26 – 30].

In the present study, two transgalactosylation products were detected, lactulose (β -D-galactosyl-(1–4)- β -D-fructose) e 1-lactulose (β -D-galactosyl-(1–1)- β -D-fructose). The influence of donor and receptor amount and pH was tested (Figure 5A). The major prebiotic production (1.84 g.L⁻¹) occurred when IED was incubated with equal amounts of lactose and fructose (200 g.L⁻¹) in pH 8.0 at 40 °C. Thereafter, the kinetic of transgalactosylation reaction was evaluated (Figure 5B). After 5h, fructose and lactose concentration equal to 200 g.L⁻¹, in pH 8.0 at 40 °C. The productivity of lactulose synthesis was 0.5 g.L⁻¹.h⁻¹ and maximum amount produced was 2.1 g. L⁻¹.

Lactulose is used in a wide variety of foods as bifidus factor or as functional ingredient for intestinal regulation [31]. Furthermore, in the pharmaceutical industry, this disaccharide can be used in the treatment of constipation, hepatic encephalopathy, liver disease complication and maintenance of glucose and insulin level in blood [32]. The enzymatic synthesis of lactulose using fructose, has been reported in recent years [33 – 35]. Song et al. [36] used β -galactosidase immobilized from *K.lactis* on silica gel to synthesize lactulose. After 1h, they produced 15.80 g.L⁻¹ using 40 % (w/v) lactose and 20% (w/v) fructose in pH 7.5 at 47 °C. Song et al. [36, 37] immobilized β -galactosidase and produced lactulose from whey lactose. The prebiotic concentration was 1.42 g.L⁻¹ and 7.68 g.L⁻¹.

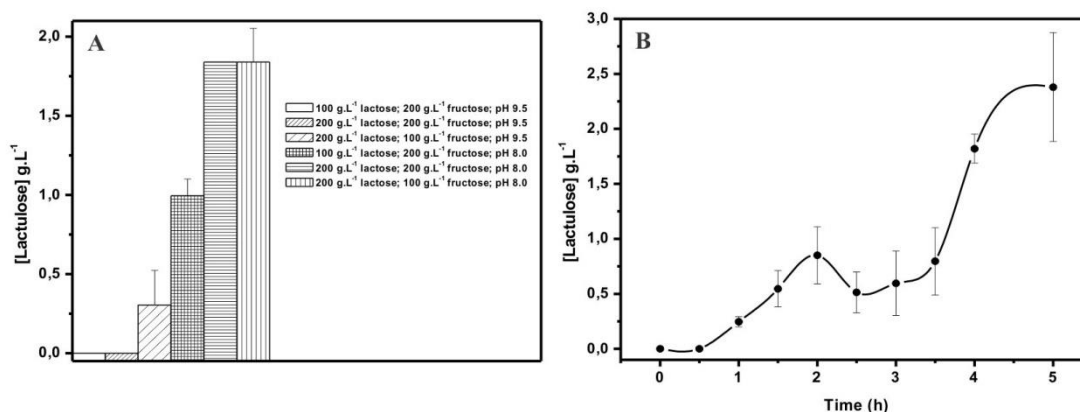


Figure 5. Analysis of donor and receptor amount and pH influence in enzymatic synthesis of lactulose (A). Time course of lactulose production from lactose and fructose. Reactions were conducted at 40 °C using lactose and fructose 200 g.L⁻¹ in 50 mM potassium phosphate buffer pH 8.0 (B).

4. Conclusion

This study aimed to covalently immobilize β -galactosidase from *K.lactis* on mPANI, optimize the immobilization process, characterize the IED and evaluate the potential of lactulose synthesis. mPANI proved be an attractive and efficient support for the immobilization due to the simplicity to synthesize the hybrid matrix and easy removal of the products from the reaction medium by applying a magnetic field. The retention of specific activity (3.5 U.mg^{-1}) was achieved in the optimum conditions of immobilization, $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ amount of enzyme on 10 mg of support, 10.2 h of incubation in pH 8.0 at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. There were changes in optimum temperature and pH profile of native and immobilized enzyme. However, difference between K_m values did not show to be statistically significant. IED was more stable in higher temperatures than soluble β -galactosidase. Moreover, it remained stable and retained 50% of enzyme activity until after ten activity cycles at $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, making the process economically viable. The optimum pH and lactose and fructose concentrations to lactulose synthesis were 8.0 and 200 g.L^{-1} , respectively, and disaccharide produced was 2.1 g.L^{-1} . The use of β -galactosidase immobilized on mPANI was promising for lactulose production.

5. Acknowledgments

Authors thank to Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) da FIOCRUZ, by electron microscopy service of Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE). The study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

6. References

1. Homaei, A., Sariri, R., Vianello, F. and Stevanato, R. (2013) *J. Chem. Biol.* 6, 185 – 205
2. Shen, M., Yu, Y., Fan, G., Chen, G., Jin, Y., Tang, W and Jia, W. (2014). *Nanoscale Res. Lett.* 9, 296 – 303.
3. Belaabed, B., Wojkiewicz, J., Lamouri, S., Kamchi, N. and Lasri, T. (2012). *J. Alloy. Compd.* 527, 137–144.
4. Reddy, K., Lee, K-P., Gopalan, A. and Kang, H-D. (2007) *React. Funct. Polym.* 67, 943–954.
5. Eş, I., Vieira, J. and Amaral, A. (2015) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2065 – 2082.
6. Murata, T. and Usui, T. (2006) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 12, 161-174.
7. Wang, H., Yang, R., Hua, X., Zhao, W. and Zhang, W. (2013) *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 6167 - 6180.
8. Sitanggang, A., Drews, A. and Kraume, M. *Bioresour. Technol.* 167, 108 – 115.
9. Hu, C., Gao, Z. and Yang, X. (2006) *Chem. Phys. Lett.* 429, 513 – 517.
10. Lalatonne, Y., Richardi, J and Pileni, M. (2004) *Nat. Mater.* 3, 121 – 125.
11. Valenzuela, R., Fuentes, M., Parra, C., Baeza, J., Duran, N., Sharma, S., Knobel, M. and Freer, J. (2009) *J. Alloy. Compd.* 488, 227 – 231.
12. Marín-Navarro, J., Talens-Perales, D., Oude-Vrielink, A., Cañada, F. and Polaina, J. (2014) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 989 - 998.
13. Güleç, H. (2013) *Colloids Surf B Biointerfaces.* 104, 83 – 90.
14. Liu, H., Liu, J., Tan, B., Zhou, F. Qin, Y. and Yang, R. (2012) *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 1287 –1295.

15. Kishore, D, Talat, M., Srivastava, O., Kayastha, A. (2012) PLoS One. 7, 1 – 13.
16. Dwevedi, A. and Kayastha, A. (2009) J. Agric. Food Chem. 57, 682 – 688.
17. Dwevedi, A. and Kayastha, A. (2009) Bioresour. Technol. 100, 2667 – 2675.
18. Wu, J., Wang, J., Li, M. Lin, J. and Wei, D. (2010) Bioresour. Technol. 101, 8936 – 8941.
19. Zhang, S., Gao, S. and Gao, G. (2010) Appl. Biochem. Biotechnol. 160, 1386 – 1393.
20. Verma, M., Barrow, C. Kennedy, J. and Puri, M. (2012) Int. J. Biol. Macromol. 50, 432 – 437.
21. Jochems, P, Satyawali, Y., Roy, S., Doyen, W., Diel, L. and Dejonghe, W. (2011) Enzyme Microb. Technol. 49, 580 – 588.
22. Neri, D., Balcão, V. Carneiro-da-Cunha, M. Carvalho Jr, L. and Teixeira, J. (2008) Catal. Commun. 9, 2334 - 2339.
23. Elnashar, M. and Yassin, M. (2009) Appl. Biochem. Biotechnol. 159, 426 – 437.
24. Kim, J., Grate, J. and Wang, P. (2008) Trends Biotechnol. 26, 639 - 646.
25. Taqieddin, E. and Amiji, M. (2004) Biomaterials 25, 1937 – 1945.
26. Grosová, Z., Rosenberg, M., Rebros, M., Sipocz, M. and Sedlácková B. (2008) Biotechnol. Lett. 30, 763 – 767.
27. Puri, M., Gupta, S., Pahuja, P., Kaur, A., Kanwar, J. and Kennedy, J. (2010) Appl. Biochem. Biotechnol. 160, 98 – 108.
28. Ansari, S., Husain, Q., Qayyum, S. and Azam, A. (2011) Food Chem. Toxicol. 49, 2107 - 2115.

29. Lu, L., Xu, S., Zhao, R., Zhang, D., Li, Z., Li, Y. and Xiao M. (2012) *Bioresour, Technol.* 116, 327 - 333.
30. Sem, S., Ray, L. and Chattopadhyay, P. (2012) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1938 – 1953.
31. Panesar, P. and Kumari, S. (2011) *Biotechnol. Adv.* 29, 940 - 948.
32. Schumann, C. (2002) *Eur. J. Nutr.* 41, 117 – 125.
33. Mayer, J., Conrad, J., Klaiber, I., Lutz-Wahl, S., Beifuss, U. and Fischer, L. (2004) *J. Agric Food Chem.* 52, 6983 - 6990.
34. Kim, Y., Park, C. and Oh, D. (2006) *Enzyme Microb. Technol.* 39, 903 - 908.
35. Hua, X., Yanga, R., Zhang, W., Fei, Y., Jin, Z. and Jiang, B. (2010) *Food Res. Int.* 43, 716 – 722.
36. Song, Y., Suh, Y., Park, C. and Kim, S. (2013) *Korean J. Chem. Eng.* 30, 160 - 165.
37. Song, Y., Shin, H., Lee, J., Park, C. and Kim, S. (2012) *Food Chem.* 133, 611 – 617.

ANEXO 2

Int J Clin Exp Pathol 2013;6(9):1861-1867
www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP1306025

Original Article

Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate

Jorge Luiz Araújo-Filho¹, Mário Ribeiro Melo-Junior^{1,2}, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,3}, Luiza Rayanna Amorim de Lima⁴, Consuelo Barreto Lins Antunes⁴, Luiz Bezerra de Carvalho Jr^{1,3}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA/UFPE, Recife, Pernambuco, 7851, Brazil; ²Departamento de Patologia, CCS/UFPE, Recife, Pernambuco, 7851, Brazil; ³Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE, Recife, Pernambuco, 7851, Brazil; ⁴Hospital Universitário Oswaldo Cruz, HUOC/UPE, Recife, Pernambuco, 3447, Brazil

Received June 24, 2013; Accepted July 23, 2013; Epub August 15, 2013; Published September 1, 2013

Abstract: This work proposes a chemiluminescent quantitative method for galectin-3 (Gal3) detection in prostate tissues. Monoclonal antibody anti-Gal3 was conjugated to acridinium ester (AE) and the complex formed with Gal3 in the prostate tissue was chemiluminescently detected. The light emission (expressed in Relative Light Unit-RLU) showed mean values higher for benign prostatic hyperplasia than normal tissues and adenocarcinoma. These differences showed to be statistically significant ($p < 0.001$). There was a linear relationship between RLU and tissue area. Furthermore, these values were dramatically reduced when the tissue samples were previously incubated with non labeled anti-Gal3. Finally, the anti-Gal3-AE solution in buffer stored at 4°C and the treated samples showed to be stable during a year and at least 72 h, respectively. Gal3 content in prostate tissue was higher in benign prostatic hyperplasia than normal tissues and much lower in adenocarcinoma. This quantitative, specific and sensitive method based on labeling antibody to acridinium ester can be applied to detect antigen in tissue.

Keywords: Chemiluminescence, galectin-3, prostate tissue, immunohistochemistry

Introduction

Galectins, a family of β -galactoside binding lectins, are multifunctional proteins involved in a variety of biological processes such as growth development, immune functions, apoptosis, and cancer metastasis [1]. The galectins have been widely used as tools to describe immunohistochemical changes in the tumor cell surface where these changes are associated with tumor cell growth by inducing apoptosis or metastasis [2]. Galectin-3 (Gal3) is one of the best studied galectins with many proposed functions in the immune system and cancer [3]. It is a small molecular weight (about 30 kDa) protein that is expressed in many types of human cells, in particular epithelial and immune cells [4]. Saraswati et alii have reported that Prostate-specific antigen (PSA) regulates Gal3 in human semen and may regulate Gal3 function during prostate cancer progression [5]. They presented evidences that PSA is a chymotrypsin-like serine protease secreted by the prostatic epithelium and normally func-

tions in liquefaction of semen following ejaculation. Furthermore, PSA is implicated in the promotion of localized prostate tumors and bone metastases by its roles in immunomodulation, invasion, and apoptosis. The Gal3 is highly expressed in normal but not in malignant cells [6].

In prostate cancer, histopathological analysis has a great clinical relevance. However, immunohistochemical methods qualitatively analyzed have often shown great disparity and variability of results among different observers. Thus, in order to provide a numerical scale and reproducible patterns of marking tissue, increasing sensitivity and quality control analysis, it has been increasingly technological refinements using automated morphometric methods [7]. Another approach could be the use of chemiluminescent procedure. The chemiluminescence, a process in which excited atoms or molecules through chemical reactions release their excess energy as light has been

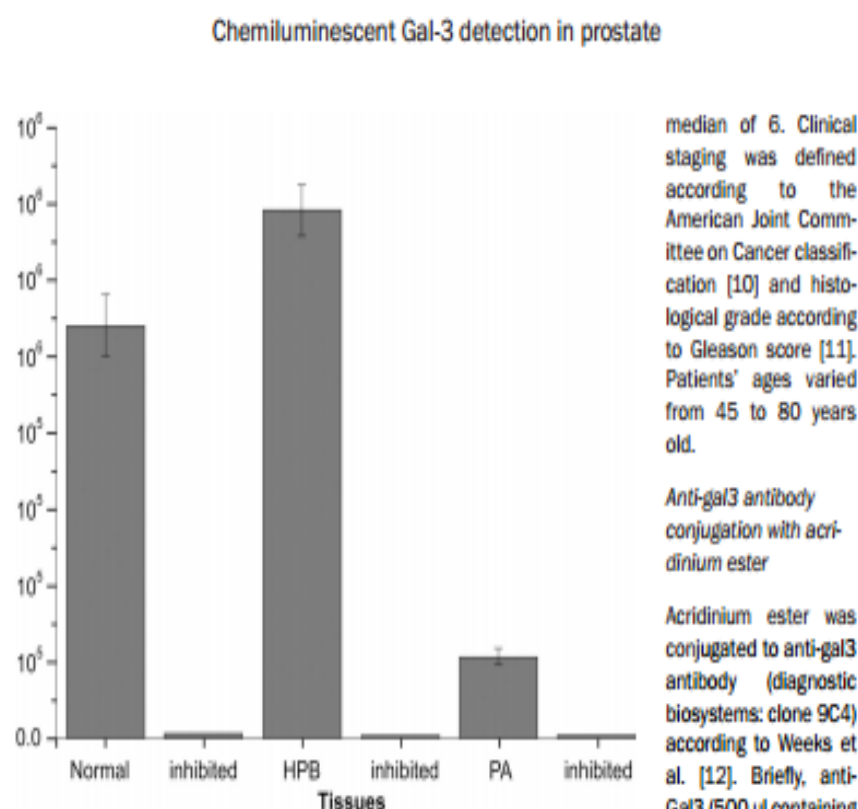


Figure 1. The light emission (RLU) from normal, benign prostatic hyperplasia (HPB) and adenocarcinoma (AP) tissues ($n = 15$ and triplicates). The inhibited columns were obtained by incubating the tissues with non-labeled antibody previous to anti-Gal3-AE incubation. The statistical analyses showed significance between the mean values ($p < 0.001$).

the focus of research to broaden its application in various areas including in immunoassays [8].

The aim of this study was to identify the Gal3 in normal, benign and malignant prostate tissues by using a specific antibody labeled to acridinium ester (AE). Afterwards the antigen-antibody complex was revealed by chemiluminescence that is capable to detect in the range of femtomoles or attomoles (10^{-15} to 10^{-18} mol) [9]. Additionally, Gal3 was evaluated in these prostate tissues by immunohistological staining using antibody conjugated to peroxidase and digital image analysis as comparison.

Materials and methods

Human prostate specimens

Formalin-fixed and paraffin-embedded benign hyperplasia (15); adenocarcinoma (15) and normal (15) prostate tissues were obtained from the archives of the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco, Brazil. These diagnostics were established by one of the authors (CABL). The Gleason histological grade ranged from 5 to 9, with the mean of 6.7 and

median of 6. Clinical staging was defined according to the American Joint Committee on Cancer classification [10] and histological grade according to Gleason score [11]. Patients' ages varied from 45 to 80 years old.

Anti-gal3 antibody conjugation with acridinium ester

Acridinium ester was conjugated to anti-gal3 antibody (diagnostic biosystems: clone 9C4) according to Weeks et al. [12]. Briefly, anti-Gal3 (500 μ l containing 2 mg of protein) was incubated with 15 μ l of acridinium ester solution (0.2 mg diluted in 400 μ l of N,N-dimethylformamide) for 1 h at

25°C. The conjugate (anti-Gal3-acridinium ester) was applied to a column of Sephadex G-25 (10 x 1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2 (100 ml) and eluted with this buffer. Aliquots (1 ml) were collected and their protein content was spectrophotometrically determined at 280 nm and chemiluminescence assayed. The aliquots containing protein and chemiluminescence were pooled, dialyzed overnight against 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, and kept at -10°C until use.

Chemiluminescent immunoassay

Paraffin sections (8 μ m) of samples were cut, transferred to glass slides, deparaffinized in xylene (1st for 5 min and 10 dips in 4 successive containers with xylene) and hydrated in graded alcohols (3 x 100% and 1 x 70% - 10 dips each). Afterwards tissue slices were incubated with anti-gal3-AE (100 mL - 100 mg mL⁻¹) for 2 h at 4°C, followed by washings (2 x 5 min) with 5 mL of 10 mM phosphate buffer, containing 0.15 M NaCl (PBS), pH 7.2. Then the tissues were transferred to polypropylene test tubes

Chemiluminescent Gal-3 detection in prostate

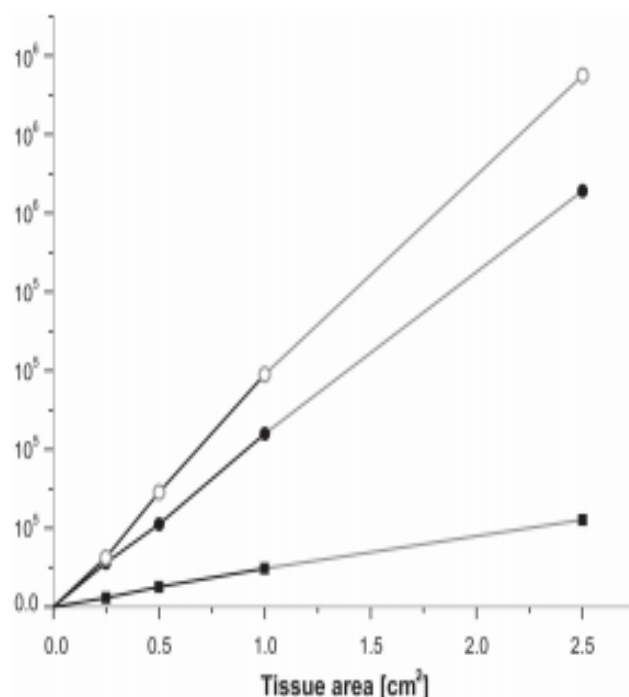


Figure 2. Relationship between RLU and the tissue area of benign prostatic hyperplasia (○), normal tissue (●) and adenocarcinoma (■).

with a volume of 50 mL of PBS. Finally, solutions of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 (50 μ L) and 0.25 M NaOH (50 μ L) were added for chemiluminescent measurement using a luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. Triplicate measurements were carried out throughout in this study. Anti-Gal3-AE binding inhibition assays were accomplished by incubating the tissues with non labeled Anti-Gal3 (100 mL - 100 mg mL⁻¹) for 2 h at 4°C prior to its incubation with anti-Gal3-AE. Following steps were as described previously for the binding protocol.

Immunohistochemical staining

The immunoreactivity of anti-Gal3 conjugated to peroxidase (Sigma, USA) was established according to the protocol proposed by Hsu et al. [13]. Briefly, the tissues were cut (4 mm), transferred to glass slides and deparaffinized as described above. The sections were incubated with citrate buffer at 100°C for 30 min under water vapor, washed (5 min) with PBS and incubated with lyophilized bovine serum (to avoid cross-reactions), then incubated with H_2O_2 for 5

min and washed with PBS, incubated with a solution containing monoclonal antibody anti-Gal3 (at 1:50 dilution) for 1 h at 25°C. The prostate tissues were incubated with biotinylated secondary antibody (DAKO LSAB Kit, USA). The revelation of the antibody was obtained by reaction of peroxidase visualized by incubating the tissues in a solution containing the substrate (diaminobenzidine-DAB plus H_2O_2). The sections were counter stained with hematoxylin and examined under a light microscope (Olympus BH-2, Japan).

Digital image analysis

Slices images (magnification 100x) were captured using a digital video-camera (Sony, Japan) connected to a microscope and processed using OPTIMAS™ software version 6.1 (Optimas Corporation, USA). Antibody staining patterns revealed by DAB-peroxidase reaction were obtained in gray value. Image analysis of Gal3 positive cells was carried out adjusting the equipment to consider positive viable cells only those presenting nucleus and visible staining. A correction factor (CF) was used to minimize distortions in values due to the presence of non-stained cells, according to the equation $CF = s/S$ where s means relative surface area and S the total area measured [14]. Analyses of the number of cells per area (12,234 μ m²) were developed in three random areas of stained tumor tissues.

Statistical analysis

The software OriginPro 8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) was used for the chemiluminescence data processing (expressed as mean $\pm$ standard deviation) and statistical analysis (Mann-Whitney U-test and Student t-test; $p < 0.05$).

Chemiluminescent Gal-3 detection in prostate

Table 1. Result of the immunohistochemical staining from number of positive Gal3 cells in prostatic tissues evaluated by image analysis (total area per field = 12,234 μm^2)

Tissue	Average area (μm^2)
Benign prostatic hyperplasia	854.6 $\pm$ 49.7*
Prostatic adenocarcinoma	118.5 $\pm$ 21.8*
Normal prostate	242.9 $\pm$ 24.6

* $p < 0.001$.

Results

Here, AE was conjugated to the anti-Gal3 antibody and used to identify the Gal3 in prostate tissues. Figure 1 shows the RLU mean values obtained for normal ($1.083 \times 10^6 \pm 81044$ RLU), benign prostatic hyperplasia ($1.38 \times 10^6 \pm 67799$ RLU) and adenocarcinoma ($214,234 \pm 22,172$ RLU). These mean values showed to be statistically significant ($p < 0.001$). These values were dramatically reduced when the tissue samples were previously incubated with non labeled anti-Gal3 antibody yielding values of $10,617 \pm 4,496$ RLU; $8,837 \pm 969$ RLU and $5,687 \pm 1,011$ RLU, respectively. It is important to call attention to the small standard deviations of these mean values although samples were collected from different individuals. Furthermore, Figure 2 shows that RLU is directly proportional to the tissue areas for all those investigated, namely, normal, benign prostatic hyperplasia and adenocarcinoma.

The anti-Gal3-AE solution in buffer stored at -10°C showed to be stable during a year presenting (50 μl) chemiluminescence of $16,804,400 \pm 431,263$ (2.6%). Furthermore, the tissue samples treated with the anti-Gal3-AE were also stable for 72 h at least yielding RLU values of $1,087,250 \pm 39,728$ (6%); $1,311,200 \pm 40,035$ (3%) and $211,059 \pm 12,977$ (6%) for the normal, hyperplasia benign prostatic and prostatic adenocarcinoma samples, respectively.

The immunohistochemical staining studies demonstrated significant differences in the patterns of Gal3 expression in the tissues (Table 1). Benign prostatic hyperplasia presented higher average stained area than the prostatic adenocarcinoma cells and normal prostate. These results corroborate the chemiluminescence data.

Figure 3 presents typical microscopic view of histological specimens of prostate tissues stained with anti-Gal3-peroxidase/DAB and counter stained with hematoxylin.

Discussion

In our lab, the use of chemiluminescence has been used to reveal the glycode of normal, fibroadenoma and invasive duct carcinoma tissues using lectins (Concanavalin A and Peanut agglutinin) labeled with AE [15, 16]. Photon emission observed during the breakage of the chemical bound between lectin and AE was quantified, expressed in RLU and correlated to the labeling of the normal and transformed tissues. The lectin chemiluminescence was higher in fibroadenoma and IDC than in normal tissue for both lectins tested. The relationship RLU emission versus tissue area described a linear and hyperbolic curve for IDC and fibroadenoma, respectively, using Con A whereas hyperbolic curves for both transformed tissues using PNA. Recently, immunochemiluminescence detection method for the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in breast tumors was proposed [17].

The antibody anti-galectin-3 was also immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol semi-interpenetrated network and the antibody-matrix was capable to capture the serum antigen galectin-3 [18]. ELISA procedure was set up to quantify the Gal3 levels in sera from patients with prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia and healthy individuals. The optical density (Gal3 level) values established for the sera from patients were lower compared with those found for the healthy individuals. Also, for comparative effect, the Gal3 expression in the prostate tissue through immunohistochemistry was evaluated. Gal3 showed a significant increase and reduction of the cytoplasmatic protein expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma, respectively, compared with the normal prostate.

Qualitative and quantitative changes in the glycoprotein components of cell membranes are highly significant in the development and progression of many neoplastic processes [19]. In cancer cells the increased expression of surface carbohydrates has been widely documented by histochemistry and immunohistochemis-

Chemiluminescent Gal-3 detection in prostate

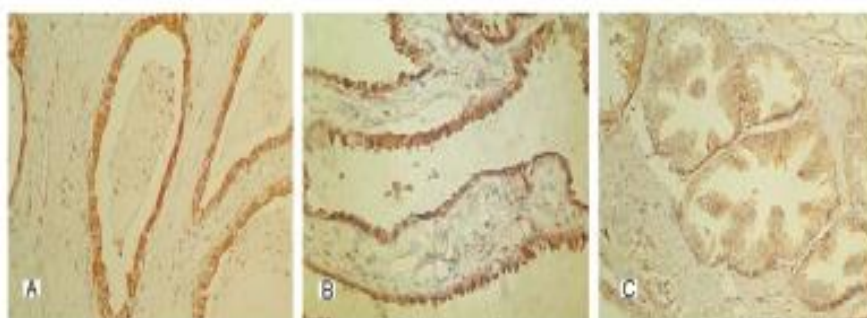


Figure 3. Typical immunohistochemical staining for Gal3 in prostate tissues with benign prostatic hyperplasia (A), normal tissue (B) and adenocarcinoma (C). All images were obtained with 200x magnification.

try [20]. The galectins, in particular, are being tested as sensitive tools, stable and easy to use to distinguish transformed cells and non-transformed [21-24].

Galectins are found in many cell types and tissues, and various functions are described to them. The galectins have received increasing scientific attention due to its various functions, not only in biochemistry, but also in medicine with possible pharmacological activity. Among the most extensively studied galectins are Gal3, a protein with diverse biological roles [25].

About functional properties of galectin-3, described so far, it is clear that this one has several roles in the pathogenesis of cancer, proliferation and dissemination of metastases. In addition, changes were found not only in the expression of galectin-3 but also in their intracellular distribution in certain types of cancers [26, 27].

Our results are consistent with those described in the literature on prostate cancer, showing that a reduced expression of galectin-3 (Figure 3C) occurs as the disease progresses [25, 28]. And conversely, a higher expression of this protein in tissue fragments of normal when compared to the malignant counterpart [6].

Several evidences have demonstrated the great importance of interactions between cancer cells and residual carbohydrates during cancer progression [21], suggesting the existence of a large number of molecules involved in this biological event.

In the present study analysis based on immunohistochemical staining identified a cytoplas-

mic expression of Gal3 more intense in cases of benign prostatic hyperplasia (Figure 3A) and normal tissue (Figure 3B). This finding corroborates previous reports [6, 21].

From the results above one can conclude that there was a statistically significant reduction in tissue expression of Gal3 in prostatic adenocarcinoma cells compared to normal tissue. Benign prostatic hyperplasia showed a significant increase in cellular expression of Gal3 when compared with the counterpart malignant and normal tissue. Furthermore, there was a linear relationship between the Gal3 chemiluminescent detection and tissue area in all examined prostate samples. The anti-Gal3-AE conjugate and the treated samples showed to be stables for one year and 72 h, respectively. Thus the antibodies conjugated to acridinium ester can be used as tool to quantify the changes, minimizing the subjectivity of the analysis. This method demonstrated that immunochemiluminescence can be value in tissue analysis, showing high sensitivity and perspective of application in early diagnosis due to its detection at the molecular level.

Acknowledgements

The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Ciência de Pernambuco (FACEPE) for financial support.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Departamento de Bioquímica e

Chemiluminescent Gal-3 detection in prostate

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. Av. Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil, 7851. Tel: +55 81 2126 8484; Fax: +55 81 2126 8485; E-mail: lbcj@hotmail.com.br

References

- [1] Liu FT and Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 158-182.
- [2] Dumic J, Dabelic S and Fogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616-635.
- [3] Salomonsson E, Carlsson MC, Osla V, Hendus-Altenburger R, Kahl-Knutson B, Oberg CT, Sundin A, Nilsson R, Nordberg-Karlsson E, Nilsson UJ, Karlsson A, Rini JM and Leffler H. Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. *J Biol Chem* 2010; 285: 35079-35091.
- [4] Yu LG. Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2: 177-180.
- [5] Saraswati S, Block AS, Davidson MK, Rank RG, Mahadevan M and Diekmann AB. Galectin-3 is a substrate for prostate specific antigen (PSA) in human seminal plasma. *Prostate* 2011; 71: 197-208.
- [6] Ahmed H, Banerjee PP and Vasta GR. Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 241-246.
- [7] Rashbass J. The impact of information technology on histopathology. *Histopathology* 2000; 38: 1-7.
- [8] Zhao L, Sun L and Chu X. Chemiluminescence immunoassay. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2009; 28: 404-415.
- [9] Campbell AK, Hallett MB and Weeks I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. *Methods Biochem Anal* 1985; 31: 317-416.
- [10] Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP and Kennedy BE. Manual for Staging of Cancer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1992.
- [11] Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992; 23: 273-279.
- [12] Weeks I, Sturgess M, Brown RC and Woodhead JS. Immunoassays using acridinium esters. *Methods Enzymol* 1986; 133: 366-387.
- [13] Hsu SM, Raine L and Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
- [14] Van Bommel JH and Musen MA. Biostatistical Methods. Handbook of Medical Informatics. Springer-Verlag, 1997; pp: 387-497.
- [15] Campos LM, Cavalcanti CL, Lima-Filho JL, Carvalho LB and Beltrão EL. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers* 2006; 11: 480-484.
- [16] Brustein VP, Cavalcanti CLB, Melo Júnior MR, Correia MT, Beltrão EIC and Carvalho Júnior LB. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 166: 268-275.
- [17] Régio MUBM, Cordeiro MF, Cavalcanti CLB, Carvalho Júnior LB and Beltrão EIC. Immunohistochemiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Dis Markers* 2013; 34: 373-377.
- [18] Melo-Junior MR, Araújo-Filho JL, Lins CA, de Pontes-Filho NT and de Carvalho LBJ. Immobilization of anti-galectin-3 onto polysiloxane-polyvinyl alcohol disks for tumor prostatic diseases diagnosis. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160: 2198-2207.
- [19] Bao L, Haque A, Jackson K, Hazari S, Moroz K, Jetly R and Dash S. Increased Expression of P-Glycoprotein Is Associated with Doxorubicin Chemoresistance in the Metastatic 4T1 Breast Cancer Model. *Am J Pathol* 2011; 178: 838-852.
- [20] Kim MS, Kwon S, Kim T, Lee ES and Park JK. Quantitative proteomic profiling of breast cancers using a multiplexed microfluidic platform for immunohistochemistry and immunocytochemistry. *Biomaterials* 2011; 32: 1396-1403.
- [21] van den Brule F, Callicee S and Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 2004; 19: 537-542.
- [22] Callicee S, Castronovo V, Bracke M and van den Brule F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 2004; 23: 7527-7536.
- [23] Callicee S, Castronovo V and van den Brule F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 983-992.
- [24] van den Brule FA, Waltregny D, Liu FT and Castronovo V. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer* 2000; 89: 361-367.
- [25] Wang Y, Nangia-Makker P, Tait L, Balan V, Hogan V, Pienta KJ and Raz A. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *Am J Pathol* 2009; 174: 1515-1523.
- [26] Stannard KA, Collins PM, Ito K, Sullivan EM, Scott SA, Gabutero E, Darren GI, Low P, Nilsson UJ, Leffler H, Blanchard H and Ralph SJ. Galeo-

Chemiluminescent Gal-3 detection in prostate

- tin inhibitory disaccharides promote tumour immunity in a breast cancer model. *Cancer Lett* 2010; 299: 95-110.
- [27] Krzeminski M, Singh T, Andre S, Lensch M, Wu AM, Bonvin AM and Gabius HJ. Human galectin-3 (Mac-2 antigen): defining molecular switches of affinity to natural glycoproteins, structural and dynamic aspects of glycan binding by flexible ligand docking and putative regulatory sequences in the proximal promoter region. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810: 150-161.
- [28] Ellerhorst J, Nguyen T, Cooper DN, Lotan D and Lotan R. Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *Int J Oncol* 1999; 14: 217-224.

ANEXO 3

Int J Clin Exp Pathol 2014;7(7):3800-3808
www.ijcep.com /ISSN:1838-2825/UCEP0000327

Original Article

Evaluation of glycophenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay

Lúcia Patrícia Bezerra Gomes da Silva¹, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{1,2}, Luiza Rayanna Amorim de Lima¹, Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti³, Mariana Montenegro de Melo Lira³, Maria da Paz Carvalho da Silva¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão¹, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior¹

¹Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil; ²Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), Garanhuns, Pernambuco, Brasil; ³Departamento de Patologia e Hospital das clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

Received March 25, 2014; Accepted May 23, 2014; Epub June 15, 2014; Published July 1, 2014

Abstract: This work aimed to evaluate the glycophenotype in normal prostate, benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic adenocarcinoma (PCa) tissues by a chemiluminescent method. Concanavalin A (Con A), Ulex europaeus agglutinin (UEA-I) and Peanut agglutinin (PNA) lectins were conjugated to acridinium ester (lectins-AE). These conjugates remained capable to recognize their specific carbohydrates. Tissue samples were incubated with lectins-AE. The chemiluminescence of the tissue-lectin-AE complex was expressed in relative light units (RLU). Transformed tissues (0.25 cm² by 8 µm of thickness) showed statistical significant lower α-D-glucose/mannose (BPH: 226,931 ± 17,436; PCa: 239,520 ± 12,398) and Galβ(1-3)-GalNAc (BPH: 28,754 ± 2,157; PCa: 16,728 ± 1,204) expression than normal tissues (367,566 ± 48,550 and 409,289 ± 22,336, respectively). However, higher α-L-fucose expression was observed in PCa (251,118 ± 14,193) in relation to normal (200,979 ± 21,318) and BPH (169,758 ± 10,264) tissues. It was observed an expressive decreasing of the values of RLU by inhibition of the interaction between tissues and lectins-AE using their specific carbohydrates. The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectin-AE in both transformed tissues. These results indicated that the used method is an efficient tool for specific, sensitive and quantitative analyses of prostatic glycophenotype.

Keywords: Chemiluminescence, lectins, carbohydrates, prostatic cancer, benign prostatic hyperplasia

Introduction

Histochemistry has been a powerful tool in cancer diagnosis and many techniques have been reported in order to identify their pathological molecular alterations. Among cell differentiation/dedifferentiation the oligosaccharide composition and distribution in the cell surface glycoconjugates is under intensive analysis [1]. Lectins have been used to characterize the cancer cell glycophenotype. The most employed visualization of the binding between lectin-carbohydrate in histochemistry is based on enzyme, particularly, peroxidase. The conventional methods and parameters adopted by the analysts in the biopsy analysis are usually based on subjective procedures [2]. It should be advisable to introduce specific and quantita-

tive procedures to assist the morphological analysis.

In our lab, histochemistry chemiluminescence has been proposed replacing enzyme as label by luminescent compound [3-6]. Chemiluminescence has been known to be a powerful analytical technique that exhibits high sensitivity with ultra-sensitive detection limits (atto-mole-septomole), selectivity, development of rapid assays and a broad range of analytical applications [7].

Here, the same approach is proposed to evaluate the glycophenotype in prostatic neoplasm. Prostate fragments diagnosed as benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic adenocarcinoma (PCa) and normal human prostate were investigated.

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer and the sixth leading cause of cancer death in males [8]. To date, the diagnosis of PCa is based on serum prostate-specific antigen (PSA) testing, digital rectal examination (DRE) and defined by histological examination of prostate core needle biopsies defining the degree of tumor malignancy by the Gleason score [9]. However, this value depends on the analyst. For this reason some methodologies have been tested for helping this widely used technique [10].

In this work the lectins Concanavalin A (ConA), peanut agglutinin (PNA) and Ulex europaeus agglutinin (UEA-I), respectively, specific to α -D-glucose/mannose, Gal- β (1-3)-GalNAc and α -L-fucose, were conjugated to acridinium ester (AE). The derivatives (lectin-AE) were used to evaluate the glycophenotype of prostate tissues (PCa, HBP and normal). Previous reports have used these lectins to evaluate the glycode of prostate tissues but labeling them with peroxidase [11-13]. Thus a comparison could be established between the present procedure and those contributions. Besides these are biological relevant carbohydrate residues among others [1].

Material and methods

Reagents

N-hydroxy succinimide-activated dimethyl acridinium ester (DMAE-NHS)/1988-1-53-2/Organic Lab was kindly supplied by Dr. H. H. Weetall. Con A, PNA, UEA-I, N,N-dimethylformamide, trypsin from porcine pancreas, methyl- α -D-mannoside, D-galactose, α -L-fucose and Sephadex G-25 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chemiluminescent detection was performed using Siemens Reagent TSH 500T (Siemens Medical Solutions Diagnostics; Malvern, PA, USA) composed of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 and 0.25 M NaOH. Xylene and ethanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemical reagents used were of analytical grade.

Samples

Prostate fragments diagnosed as BPH (n=48), PCa (n=50) and normal human prostate (n=5) were obtained through paraffin-embedded

biopsies from Tissue Bank of the Clinic Hospital at the Federal University of Pernambuco, Northeastern Brazil. The service pathologists under Dr. Mariana Montenegro de Melo Lira leadership performed the diagnosis of prostatic neoplasms. Patient's ages for BPH and PCa varied between 47 and 89 years (mean 64) and 58 and 84 years (mean 67), respectively. The Health Science Centre Bioethical Board from Federal University of Pernambuco, Brazil CEP/CCB/UFPE No 195/08, approved this study.

Con A, PNA and UEA-I conjugations with acridinium ester (AE)

AE was conjugated to lectins according to [14]. Briefly, lectins (1 mL containing 2 mg of protein) were incubated with 10 μ L of acridinium ester solution (0.2 mg diluted in 400 μ L of N,N-dimethylformamide) for 1 h at 25°C under rotary stirring. The conjugate (lectin-AE) was applied to a column of Sephadex G-25 (10 $\times$ 1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, containing 0.15 M NaCl (PBS) pH 7.2, and eluted with this buffer. Aliquots (1 mL) were collected and their protein content was spectrophotometrically determined at 280 nm. Chemiluminescence of the same aliquots was also assayed with solutions of 0.5% H_2O_2 in 0.1 N HNO_3 (50 μ L) and 0.25 M NaOH (50 μ L) using a luminometer Modulus Single Tube 8200-001 (Turner Biosystems, USA). The emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. After conjugation, Con A-AE and PNA-AE were evaluated regarding the maintenance of its carbohydrate recognition property (hemagglutinating activity) using glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes and human erythrocytes for UEA-I-AE (Beltrão et al., 1988). Fractions corresponding to protein and chemiluminescence peaks were pooled and protein concentration was measured [14].

Lectin histochemistry

Paraffin section (8 μ m) of samples were cut, transferred to glass slides, deparaffinized in xylene (once 5 min, and three-fold 1 min) and rehydrated in graded alcohols (three-fold 100% and once 70% - 1 min each). Slides were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution at 37°C for two minutes. Slides were washed (twice, 5 min each time) with PBS. Afterwards tissue slices

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

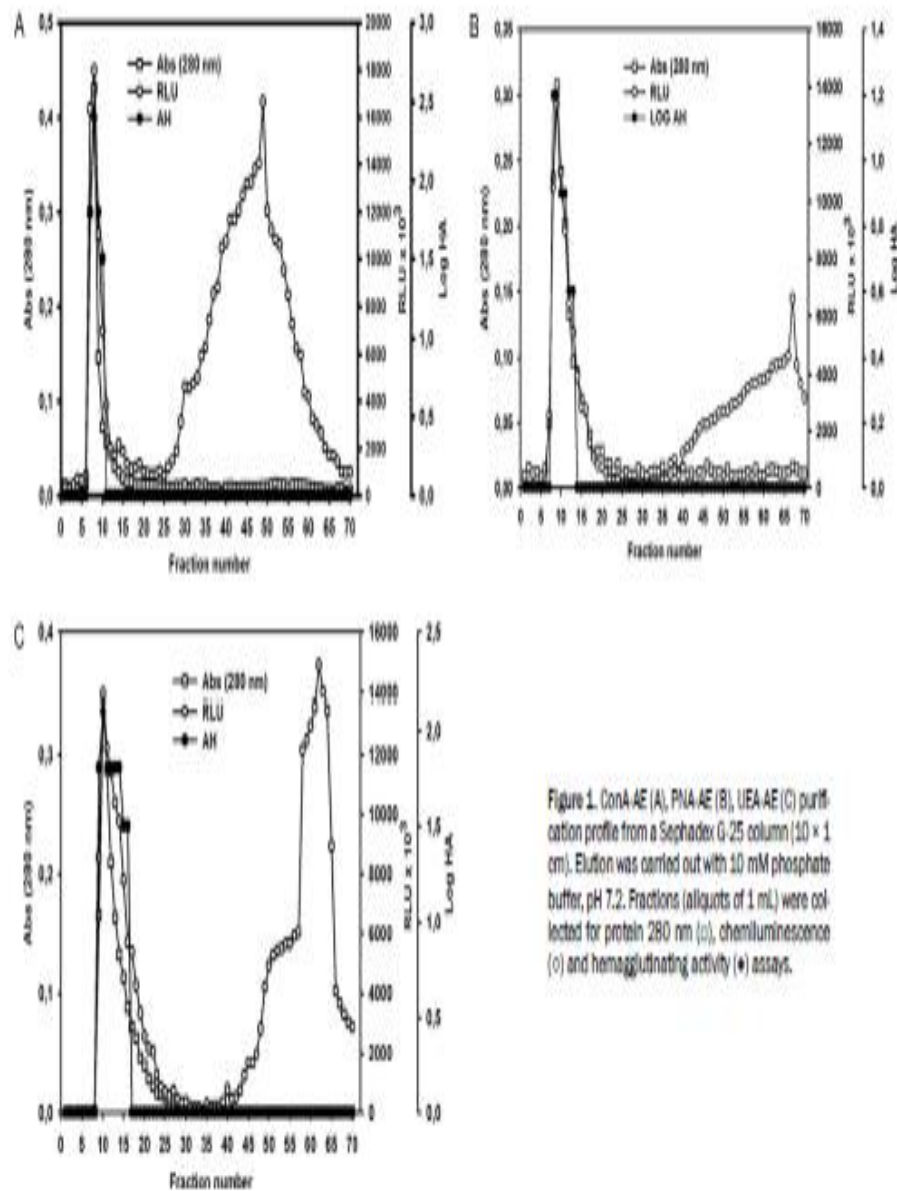


Figure 1. ConA-AE (A), PNA-AE (B), UEA-AE (C) purification profile from a Sephadex G-25 column (10 x 1 cm). Elution was carried out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions (alliquots of 1 mL) were collected for protein 280 nm (○), chemiluminescence (□) and hemagglutinating activity (●) assays.

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

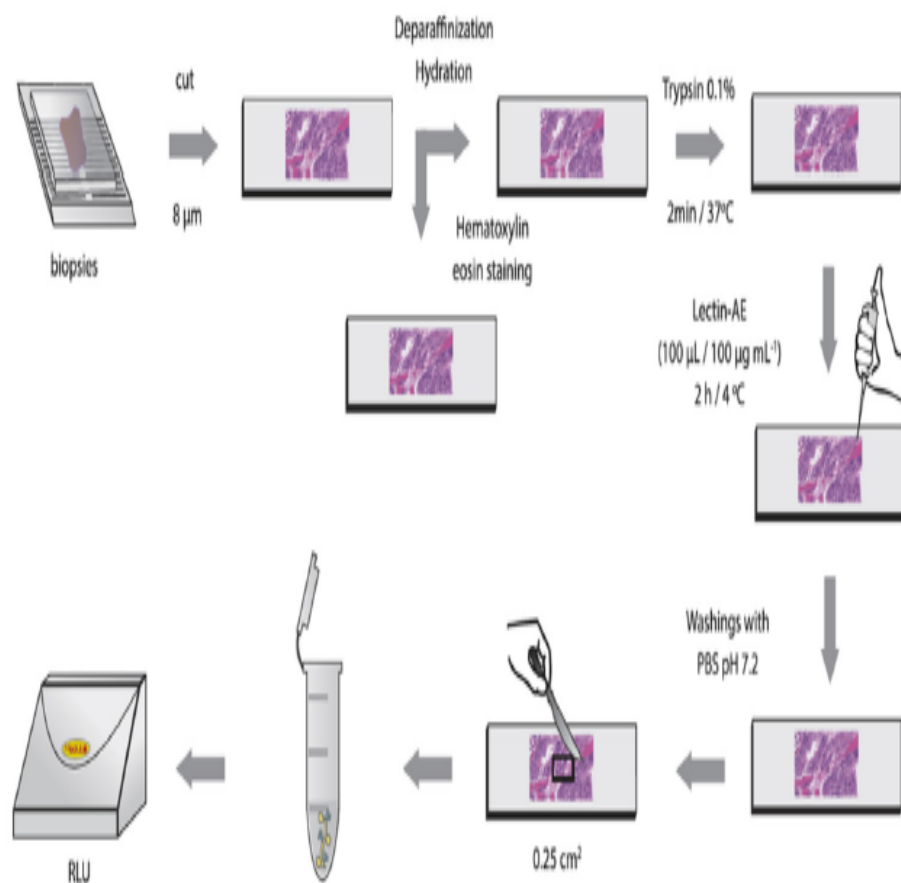


Figure 2. Scheme of the chemiluminescent lectin histochemistry. Paraffin section (8 µm) of biopsies being cut, transferred to glass slide, deparaffinized, rehydrated, treated with trypsin, washed with PBS, incubated with lectins-AE and again washed with PBS. Afterwards the squared-shaped area of tissue section being cut and transferred to a polypropylene test tub and, finally, the chemiluminescence measured and expressed as relative light unit (RLU). A duplicate of the deparaffinized and rehydrated tissue sample was hematoxylin eosin stained for transformed tissue identification.

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

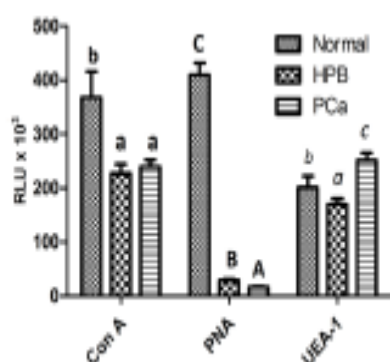


Figure 3. Chemiluminescence in normal prostate tissues (n=5), benign prostatic hyperplasia (n=49) and prostate adenocarcinoma (n=50), using the conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE. Different letters indicate statistically significant. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.

were incubated with lectine-AE (100 μ L containing 10 μ g of protein) for 2 h at 4°C, followed by washing (three-fold 5 min) with 15 mL of PBS. The area corresponding to tissue section (square-shaped) was defined as 0.25 cm² using a homemade mold. Previous to chemiluminescent assay, slices from the selected paraffin-embedded biopsies were stained with hematoxylin eosin and examined by optic microscopy for localizing the tumor area. Then the tissues were cut with a bistoury, removed from glass slides and transferred to a polypropylene test tub containing 50 μ L of PBS. Finally, RLU from tissue-squared samples were assayed as described above. Triplicate measurements were carried out throughout this study. Lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating each lectin solution with 300 mM methyl- α -D-mannoside (Con A), D-galactose (PNA) and α -L-fucose (UEA-I) for 45 min at 25°C prior to their incubation with tissues. The following steps were those described for the binding protocol (after Lectin-AE incubation).

Area versus carbohydrate expression correlation

The profile of carbohydrate expression, revealed by chemiluminescent emission due to specific lectin binding, was also evaluated as a function of tissue area (0.125 to 1.0 cm² using appropriate homemade molds). These different tissue size samples of BPH and PCa were processed similarly as above described (lectin histochem-

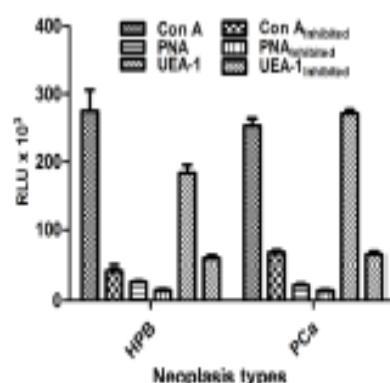


Figure 4. Lectin binding inhibition assay in prostate tissues diagnostic as benign prostatic hyperplasia (n=5) and prostate adenocarcinoma (n=5). The conjugate ConA-AE, PNA-AE and UEA-AE were inhibited using, respectively, methyl- α -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.

istry) using Con A-AE, PNA-AE and UEA-AE conjugates.

Statistical analysis

The software Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) was used for the statistical analysis and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Obtained data were compared using ANOVA test followed by post-hoc Tukey test for Con A-AE and UEA-AE results and Kruskal-Wallis followed by post-hoc Conover test for the PNA-AE results ($P < 0.05$).

Results

A typical purification profile of Con A, PNA and UEA-I lectine conjugated to acridinium ester is demonstrated in Figure 1 (A, B and C, respectively). It can be observed that all elution profiles showed absorbance 280 nm (protein) and chemiluminescence peaks around the 10th fraction, indicating that the lectins obtained from these aliquots were conjugated to acridinium ester. The other chemiluminescence peaks without concomitant protein presence corresponded to the free ester. Furthermore, the figure demonstrates that after the process of conjugation and elution all lectin conjugates were still capable to recognize their specific carbohydrates by hemagglutinating activity assay. These results showed that the conjugation did

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

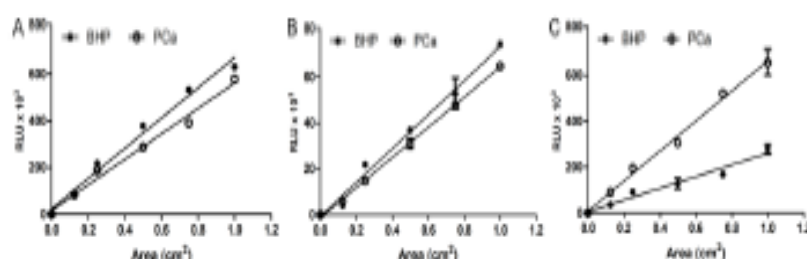


Figure 5. Relationship between RLU and area (0.125 to 1.0 cm²) of prostate tissue diagnosed as benign hyperplasia prostatic and adenocarcinoma prostate by using Con A-AE (A), PNA-AE (B) and UEA-AE (C) conjugates. All measurements are mean $\pm$ SD of triplicate.

not cause lectin structure alterations to interfere their carbohydrate recognition sites.

Figure 2 schematically illustrates this chemiluminescent lectin histochemistry procedure. Con A-AE, PNA-AE and UEA-AE conjugates were used to investigate the glycophenotype in prostatic normal and neoplastic tissues. The finding results are displayed in Figure 3. It was observed a lower expression of α -D-glucose/mannose residues, recognized by Con A-AE, between the BHP ($228,831 \pm 17,438$ RLU) and PCa ($238,520 \pm 12,388$ RLU) tissues and the normal ($387,588 \pm 48,550$ RLU). The transformed prostatic tissues presented an expression of α -D-glucose/mannose significantly lower ($p < 0.05$) when compared to normal prostatic tissues. However the difference between malignant and benign tissues was not statistically significant.

The expression pattern of β -Gal(1-3)-GalNAc also decreased in BHP ($28,754 \pm 2,157$ RLU) and PCa ($18,728 \pm 1,204$ RLU) compared to normal tissues ($408,289 \pm 22,338$ RLU). Nevertheless, statistic significant differences were observed among the tissues (BHP and PCa) and between these two conditions and normal tissue.

In relation to α -L-fucose it was observed an increase of the expression in PCa ($251,118 \pm 14,183$ RLU) compared to normal ($200,879 \pm 21,318$ RLU) and BHP ($188,758 \pm 10,284$ RLU) tissues. These differences were statistically significant.

Inhibition assays (Figure 4) was performed using methyl- α -D-mannopyranoside, D-galactose and D-fucose sugars for Con A-EA, PNA-EA and UEA-EA, respectively. It was observed an

expressive decreasing of the RLU values for all inhibited lectins-AE. However, the inhibition of the PNA-AE was relatively lower (from $27,887 \pm 1,849$ to $15,242 \pm 2,738$) in BHP and PCa tissues (from $22,830 \pm 1,118$ to $14,383 \pm 1,881$). These decreases in RLU values suggest that non-specific binding between the lectins-EA and cell surface glycoconjugates played not relevant role.

The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectins-AE and transformed tissues (Figure 5). These results reveal that the intensity of emitted light is directly proportional to available tissue area as well as to the content of exposed carbohydrate residues.

Discussion

Glycans are involved in several physiological and pathological conditions such as host-pathogen interactions, inflammation, development and malignancy [15]. The cancer is associated with glycoylation alterations in glycoproteins and glycolipids [16]. These changes can affect interactions between tumor cell-surface glycans and endogenous lectins, which may determine the metastatic potential of the tumor cell [17]. Several common structural changes occur in tumor glycans, including increases in the level of truncation and branching of structures as well as an increased expression of unusual terminal sequences [18].

Studies presented evidences suggesting that the glycoylation of proteins was modified in both BHP and prostatic carcinoma [11-13]. However, these reports employed different approaches from this work. Lectins were

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

labeled with peroxidase and the stained tissues were arbitrarily quantified by image analysis.

The present study demonstrated that the transformed prostatic tissues presented an expression of α -D-glucose/mannose significantly lower compared to normal prostatic tissues. However the difference between malignant and benign conditions was not statistically significant. These results disagree with those reported by [13], where they noted an increase of α -D-glucose/mannose expression in hyperplastic tissues compared to normal and prostatic adenocarcinoma tissues. Other study, also observed a high expression of glucose/mannose residues in prostatic tissue; however, it was not observed significant differences among the normal, benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma tissues.

The recognition of the pattern of Gal- β (1-3)-GalNAc expression obtained by PNA-AE according to this work showed a decreasing in these glycans with the tissue transformation process. The RLU values (Gal- β (1-3)-GalNAc expression) presented the following order: normal tissue > BHP > PCa. These results are consistent with those demonstrated by [13], despite the difference of methodologies. However, [11] reported different behavior. They noted that PNA presented a lower staining in normal prostate and benign prostatic hyperplasia, and a stronger staining in prostatic adenocarcinoma. It is worthwhile to call attention to the fact that RLU values for PNA-AE regarding the transformed tissues (BHP and PCa) are the lowest suggesting that Gal- β (1-3)-GalNAc expression is dramatically reduced under these conditions. The tissue-lectin-AE complex inhibition by galactose was also not so intense like for the other lectin-AE inhibition studies. The analysis of the transformed prostatic tissues with PNA-AE analysis deserves further studies.

With respect the expression of L-fucose residues identified by UEA-I-AE this work demonstrated the increasing expression in PCa compared to normal tissue. However, this expression decreased in BHP that presented a lower RLU value than PCa and normal tissue. These results corroborate those reported by [11, 12]. The increased expression of L-fucose residues in the malignant condition has also been observed in the carbohydrates fraction of

serum PSA from individuals with prostatic adenocarcinoma [18].

Lectins conjugated to a chromogenic label have been widely adopted as histochemical probes for investigation of glycophenotype from various human normal and malignant tissues [20-24]. The analyses of these stained preparations were either performed through light microscopy by an observer or quantified by several morphometric proposals. Here, chemiluminescent probes (lectins labeled with acridinium ester) provided a simple, specific and efficient tool in the quantitative determination of the tissue glycode as previously reported by [3, 4] for human breast tissue. This procedure is the first report for prostatic transformed tissues.

Here, as reported in these previous works from our lab, it was observed relationship between the light emitted by the chemiluminescent reaction (RLU) and the tissue area. The nature (linear, hyperbolic and other parameters) of this relationship difference allows to study the kinetics between lectins and tissues. Therefore, the quantitative advantage of the use of chemiluminescence to establish the glycophenotype of tissue may add other data to the analysis such as maximum carbohydrate per tissue area and association/dissociation constants.

In conclusion, normal, benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma tissue samples were incubated with Concanavalin A (Con A), Peanut agglutinin (PNA) and Ulex europaeus agglutinin (UEA-I) lectins conjugated to acridinium ester (Lectin-AE). The chemiluminescence of the tissue-lectin-AE complex expressed in relative light units (RLU) showed statistical significant differences depending on the lectin and the tissue. The light emitted was diminished by inhibiting the interaction between tissues and lectins with their specific carbohydrates. The relationship between RLU and tissue area showed a linear correlation for all lectin-AE and prostatic tissues. These results indicate that the used method is a promising tool for specific, sensitive and quantitative analyses of prostatic glycophenotype.

Acknowledgements

Authors thank to FACEPE, CAPES and CNPq (Brazilian Agencies) for financial support as well as Dr. Ian P. G. Amaral for the statistical analysis.

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

via. The technical assistance of Mr. Otaviano Tavares Costa is also thanked.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Kelzo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CDU, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel: +55(81)21268484; Fax: +55(81)21268485; E-mail: lbcj@hotmail.com.br

References

- [1] Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glyco-biology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem* 2011; 113: 236-247.
- [2] Veiga RKA, Melo-Júnior MR, Araújo-Filho JLS, Lins CAB, Teles N. Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína CerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama. *J Bras Patol Med Lab* 2009; 45: 131-37.
- [3] Campos LM, Cavalcanti CL, Lima-Filho JL, Beltrão EIC. Acridinium Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers* 2006; 11: 480-484.
- [4] Brustein VP, Cavalcanti CL, Melo-Júnior MR, Correia MT, Beltrão EIC, Carvalho LB Jr. Chemiluminescent detection of carbohydrates in the tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 166: 268-275.
- [5] Melo Rêgo MJB, Cordeiro MF, Cavalcanti CL, Carvalho LB Jr, Beltrão EIC. Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Dis Markers* 2013; 34: 373-377.
- [6] Lima LR, Bezerra MF, Almeida SM, Silva LP, Beltrão EI, Carvalho LB Jr. Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester. *Dis Markers* 2013; 35: 149-154.
- [7] Kricka LJ. Clinical applications of chemiluminescence. *Anal Chim Acta* 2003; 500: 279-286.
- [8] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
- [9] Pal RJ, Maitra NU, Mellon JK, Khan MA. Defining prostate cancer risk before prostate biopsy. *Urol Oncol* 2013; 31: 1408-1418.
- [10] Angelucci A, Pace G, Sanità P, Vicentini C, Bologna M. Tissue print of prostate biopsy: a novel tool in the diagnostic procedure of prostate cancer. *Diagn Pathol* 2011; 6: 34.
- [11] Arenas MI, Romo E, de Gaspar I, de Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Paniagua R. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Glycoconj J* 1999; 16: 375-382.
- [12] Khabaz MN, McClure J, McClure S, Stoddart RW. Glycophenotype of prostatic carcinomas. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48: 637-645.
- [13] Lima ALR, Cavalcanti CCB, Silva MCC, Palma PMG, Coelho LCBB, Beltrão EIC, Correia MTS. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 1-6.
- [14] Weeks J, Sturgess M, Brown RC, Woodhead JS. Immunoassay using acridinium esters. *Methods Enzymol* 1986; 133: 366-387.
- [15] Lowry OH, Nira J, Rosebrough A, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- [16] Kim EH, Mirek DE. Glycoproteomics-Based Identification of Cancer Biomarkers. *Int J Proteomics* 2011; 2011: 1-10.
- [17] Reis CA, Osorio H, Gomes C, David L. Alterations in glycosylations as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol* 2011; 63: 322-329.
- [18] Nangle-Makler P, Conklin J, Raz A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Tren Mol Med* 2002; 8: 187-192.
- [19] Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908>.
- [20] Dwek MV, Jenks A, Leatham AJ. A sensitive assay to measure biomarker glycosylation demonstrates increased fucosylation of prostate specific antigen (PSA) in patients with prostate cancer compared with benign prostatic hyperplasia. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411: 1935-1939.
- [21] Beltrão EIC, Correia MT, Figueiredo-Silva J, Coelho LC. Binding evaluation de isoform *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl Biochem Biotechnol* 1998; 74: 125-134.
- [22] Beltrão EIC, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueiredo-Silva J, Valença MM, Coelho LC, Carvalho LB Jr. *Perla pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem* 2003; 47: 139-142.
- [23] Melo-Junior MR, Araújo-Filho JLS, Patu VJRM, Machado MCFP, Beltrão EIC, Carvalho LBC Jr. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumor differ-

Chemiluminescent detection of prostatic glycophenotype

- ential diagnosis. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42: 455-460.
- [24] Melo-Junior MR, Cavalcanti CLB, Pontes-Filho N, Carvalho LB Jr, Beltrão EC. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. *Brazilian J Microbiol* 2008; 39: 238-240.
- [25] Sobral AP, Rego MJ, Cavalcanti CL, Carvalho LB Jr, Beltrão EI. Con A and UEA-I lectin histochemical of parotid gland mucosidermoid carcinomas. *J Oral Sci* 2010; 52: 49-54.